

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Sciences des procédés

Spécialité : Sciences des Agroressources

Par Mme Fabiola SANDOVAL-SALAS

Titre de la thèse CARACTERISATION DE LA PRODUCTION ET OPTIMISATION DU
PROCESSUS D'EXTRACTION DES COLORANTS DE LA PLANTE DE
AÑIL (*Indigofera suffruticosa* MILL)

.....

Soutenue le 23 novembre 2005 devant le jury composé de :

Mme	Elisabeth BORREDON Professeur INPT, France	Président
Mme	Ana Carmela RAMOS VALDIVIA Professeur CINVESTAV IPN, Mexique	Rapporteurs
M	P. Guillermo ANGELES ALVAREZ Professeur INECOL A.C., Mexique	
M	Gérard VILAREM* Directeur CATAR-CRITT Agroressources, France	Examineurs
Mme	Anne GSCHAEGLER MATHIS* Ingénieur de recherche CIATEJ A.C., Mexique	
M.	Antoine GASET Professeur INPT, France	

* Directeurs de thèse

RESUME

Les tendances actuelles de recherche de produits naturels ainsi que de technologies qui préservent l'environnement stimulent la recherche d'autres sources d'obtention d'indigo, plus particulièrement des sources naturelles.

Le manque de connaissances des facteurs que affectent la production et l'extraction de l'indigo des cultures de l'anil (*Indigofera suffruticosa* Mill) limite son exploitation commerciale. Les objectifs de ce travail sont d'une part la caractérisation de la production du colorant durant le cycle de culture des plantes d'anil et d'autre part la détermination des conditions les plus favorables d'extraction de ce même colorant. Pour réaliser ce travail des cultures en champs ont été établies dans les états de Veracruz et Oaxaca au Mexique pour pouvoir suivre au cours du développement de la plante la production de Poudre de Colorant Bleu (PCB). Cette partie du travail démontre que la production du colorant a lieu a la fin de l'étape de croissance de la plante, juste avant la floraison et que l'étape la plus appropriée pour réaliser la récolte est environ 5 mois après le semis. Une partie de l'étude réalisée en microscopie montre la présence de cellules qui présentent des vacuoles contenant un colorant rouge qui pourrait être le produit de la transformation du précurseur de l'indigo. A partir de différentes expériences d'extraction solide/liquide du colorant réalisées sur des échantillons de feuilles d'anil sèches les meilleures conditions obtenues sont les suivantes : relation matière première/solvant de 1 20 jusqu'à 1:6,5 ; temps d'extraction entre 6 et 8 heures ; température entre 25°C et 35°C ; pH du solvant égale a 7 pour l'extraction de l'indigo et pH=12 pour extraire l'indigo et indirubine ; temps d'aération compris entre 10 et 30 mn, pH=8 pour l'aération. Dans la dernière étape du travail une extraction assistée par ultrasons a été réalisée, à niveau laboratoire (3 litres) et pilote (30 litres). L'effet principal de l'application des ultrasons est la réduction du temps d'extraction de 6 heures en conditions classiques à 2 heures avec ultrasons. Au cours de ces expériences un effet du temps d'extraction ainsi que du pH du solvant a été observé sur les rendements d'extraction d'indigo, d'indirubine et de poudre de colorant bleu. Les rendements maximaux obtenus sont de 1,79 g de PCB/100g de feuilles sèches et 3 mg d'indigo/g de feuilles sèches a pH=7 t de 1,6 mg d'indirubine/g de feuilles sèches à pH=12.

RESUMEN

Las tendencias actuales hacia la búsqueda de productos naturales y de tecnologías de procesamiento amigables para el ambiente han estimulado la búsqueda de alternativas de producción de índigo. El desconocimiento de los factores que afectan la producción y la extracción de índigo en cultivos de añil (*Indigofera suffruticosa* Mill) ha limitado su explotación comercial para este fin. El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar la producción de colorantes en plantas de añil durante el ciclo de cultivo y conocer las condiciones más apropiadas para su extracción. Para este fin, se establecieron cultivos en campo de esta planta en los estados de Oaxaca y Veracruz, México. En este último, se evaluaron cada una de las etapas de desarrollo de la planta y se determinó que la producción de Colorante Azul en Polvo (CAP) se presenta al final de la etapa de crecimiento, cercano a la floración y que la etapa más apropiada para realizar la cosecha de los cultivos es a los 5 meses después de la siembra. En estudios de microscopia se observó en las hojas de añil la presencia de células vacuoladas que almacenan un colorante rojo. Por otra parte, mediante diferentes experimentos realizados con muestras de hoja seca de añil se determinó que las mejores condiciones para la extracción de colorantes de añil son: relación materia prima/solvente de 1:20 hasta 1:6.5; tiempo de extracción: 6 - 8 horas, temperatura: 25-35° C, pH de extracción de 7 para la extracción de índigo y 12 para la extracción de índigo e indirrubina; tiempo de aireación de 10-30 minutos; pH de aireación de 8. En otra etapa del trabajo se realizó la extracción con ultrasonido a nivel laboratorio (3 L) y semi-piloto (30 L). El principal efecto de la aplicación de ultrasonido a la extracción de colorantes de añil fue la reducción del tiempo de extracción desde 6 hasta 2 horas. En todos los casos se encontró efecto del tiempo de extracción y del pH sobre la extracción de CAP, índigo e indirrubina. Los rendimientos máximos que se obtuvieron fueron 1.79 g de CAP/100 de hoja seca y 3 mg de índigo/g de hoja seca y se obtuvieron a pH 7, mientras que para indirrubina fue de 1.6 mg/g de hoja seca y se obtuvo a pH 12.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
CAPITULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
I.1. El género <i>Indigofera</i>.....	16
I.1.1. Descripción botánica.....	16
I.1.2. Condiciones de cultivo.....	17
I.1.3. Usos de las plantas.....	18
I.1.3.1. Especies tinctorias del género <i>Indigofera</i>	18
I.1.3.2. Aplicaciones medicinales.....	21
I.1.3.3. Usos alternativos.....	23
I.2. El índigo natural.....	24
I.2.1. Antecedentes de la producción de índigo natural.....	24
I.2.2. Especies vegetales productoras de índigo.....	27
I.2.3. La ruta de biosíntesis de índigo en plantas	31
I.2.3.1. Precursores de la formación de índigo en plantas.....	31
I.2.3.2. Hidrólisis y oxidación del indicán	34
I.2.3.3. Biosíntesis de indican.....	35
I.2.4. Composición del índigo.....	37
I.2.5. Procesos de extracción de índigo a partir de plantas.....	43
I.2.5.1. Extracción de plantas de añil	43
I.2.5.2. La extracción del colorante en plantas de pastel.....	47
I.2.6. Usos del índigo y la indirubina.....	48
I.4. Alternativas de producción de índigo natural.....	48
I.4.1. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	48
I.4.2. Producción microbiana.....	49
I.5. El índigo sintético.....	51
I.5.1. Antecedentes históricos.....	51
I.5.2. Procesos de síntesis.....	52

I.6. Extracción de metabolitos empleando ultrasonido.....	56
 CAPITULO II. ESTUDIOS DE CAMPO.....	59
II.1. Preparación y germinación de las semillas.....	60
II.2. Selección del tipo de suelo y evaluación del crecimiento.....	62
II.3. Monitoreo de temperaturas y humedad relativa.....	66
II.4. Evaluación de la producción de colorante durante el ciclo de cultivo.....	67
II.5. Producción de índigo.....	70
II.6. Caracterización del crecimiento y de la producción durante el ciclo de cultivo.....	73
II.7. Conclusiones.....	76
 CAPITULO III. ESTUDIOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LOS TEJIDOS DE LAS HOJAS DE AÑIL.....	77
III.1. Morfología de las hojas de añil.....	78
III.2. Tratamiento con amoníaco.....	81
III.3. Conclusiones.....	86
 CAPITULO IV. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCION SOBRE LOS RENDIMIENTOS DE COLORANTES.....	87
 SECCIÓN IVA: Extracción sólido-liquido	
IVA.1. Pretratamiento de las muestras.....	88
IVA.1.1. Secado del añil y extracción alcalina.....	88
IVA.1.2. Tamizado.....	94
IVA.2. Parámetros de extracción.....	98
IVA.2.1. Relación materia prima-solvente.....	98
IVA.2.2. Efecto del tiempo de extracción.....	100
IVA.2.3. Efecto de la temperatura.....	104
IVA.2.4. Evaluación del efecto del pH del solvente.....	107

IVA.3. Evaluación de las condiciones de aireación.....	112
IVA.3.1. Efecto del tiempo.....	112
IVA.3.2. Efecto del pH.....	113
IVA.3. Conclusiones.....	116

SECCIÓN IVB: EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

IVB.1. Extracción a nivel laboratorio.....	118
IVB.1.1. Evaluación de la temperatura y del pH.....	119
IVB.1.2. Extracción de CAP.....	121
IVB.1.3. Extracción de índigo.....	123
IVB.1.4. Extracción de indirrubina.....	126
IVB.2. Extracción en equipo de 30 L.....	128
IVB.2.1. Extracción sin control de pH.....	128
IVB.2.2. Extracción a pH controlado.....	131
IVB.3. Conclusiones.....	134

CAPITULO V. METODOLOGIAS EXPERIMENTALES

V.1. Métodos de extracción de CAP.....	136
V.1.1. Método general de extracción (EC-1).....	136
V.1.2. Extracción por ultrasonido (EC-2).....	137
V.2. Preparación de soluciones tampón para ajuste de pH (ST-1).	138
V.3. Cuantificación de CAP.....	138
V.4. Métodos de extracción y cuantificación de índigo.....	139
V.4.1. Cuantificación por HPTLC-densitometría.....	139
V.4.2. Método espectrofotométrico.....	141
V.5. Extracción y cuantificación de indirrubina.....	143
V.6. Extracción y cuantificación de taninos.....	144
V.7. Preparación de muestras para microscopía.....	145
V.7.1. Fijación en parafina.....	145
V.7.2. Fijación en polietilenglicol.....	147

CONCLUSIONES GENERALES.....	148
BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	152
ANEXOS.....	166

INDICE DE FIGURAS

I.1. Principales especies del género <i>Indigofera</i>	19
I.2. Distribución geográfica de las principales especies productoras de índigo.....	30
I.3. Estructura química del indicán (Indoxil- β -D-glucósido).....	31
I.4. Estructura química del Isatán B, propuesta por Epstein <i>et al</i> , 1967.....	32
I.5. Estructura química propuesta por Oberthur <i>et al</i> (2004) de los principales precusores de la formación de índigo presentes en plantas del género Isatis. (1) Isatán B, (2)Isatán A, (3)Forma hidratada del Isatán B, (4) Forma hidratada del Isatán A.....	33
I.6. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de indicán durante la formación de índigo e indirrubina en plantas.....	34
I.7. Biosíntesis de indicán en plantas.....	36
	37
I.8. Estructura química del índigo.....	
I.9. Grupo cromóforo presente en índigo.....	38
I.10. Formas isómeras del índigo.....	38
I.11. Estructura química de la indirrubina.....	39
I.12. Formación del compuesto “leuco” durante la reducción del índigo.....	39
I.13. Reoxidación del leucoíndigo por exposición al aire durante el teñido.....	40
I.14. Oxidación del índigo para formar isatina.....	41
I.15. Fotooxidación del dibromoíndigo.....	42
I.16. Tanques utilizados en la extracción de añil orgánico.....	44
I.17. Aireación manual del extracto de añil.....	44
I.18. Tina de reposo de añil. Se observa el vaciado de la pasta en forma manual..	45
I.19. Procedimiento utilizado en algunas regiones productoras de añil para el calentamiento de la pasta.....	46
I.20. Diagrama de procesamiento tradicional de hojas de pastel para obtener el colorante.....	47
I.21. Biosíntesis de índigo en microorganismos a partir del indol.....	50
I.22. Primera etapa en la síntesis química de índigo. Oxidación del naftaleno.....	52
I.23. Formación de ftalimida.....	53
I.24. Oxidación de la ftalimida.....	53
I.25. Etapa final del procedimiento de síntesis química de índigo.....	54
I.26. Esquema de reacciones del proceso de síntesis química de índigo que se utiliza actualmente.....	55
I.27. Proceso alterno de síntesis química de índigo.....	55

II.1. Preparación de la semilla de añil para la siembra.....	60
II.2. Aspecto de la germinación de plántulas en charolas.....	61
II.3. Plántulas de añil creciendo en charolas.....	62
II.4. Incremento en tamaño de las plantas de añil durante el ciclo de cultivo, en dos diferentes tipos de suelo.....	63
II.5. Evolución del crecimiento de cultivos de añil durante el ciclo de cultivo en dos diferentes tipos de suelo.....	63
II.6. Aspecto de los cultivos de añil durante el crecimiento.....	64
II.7. Monitoreo de la humedad relativa durante el ciclo de cultivo de añil.....	66
II.8. Monitoreo de la temperatura durante el ciclo de cultivo de añil.....	67
II.9. Contenido de CAP en las hojas de añil durante el ciclo de cultivo.....	68
II.10. Comparación de medias de CAP por el método de Tukey.....	69
II.11. Concentración de índigo en el CAP durante el ciclo de cultivo de añil.....	70
II.12. Rendimientos de índigo en las hojas de plantas de añil durante un ciclo de cultivo.....	71
II.13. Comparación de medias de CAP por el método de Tukey.....	72
II.14. Rendimientos de colorante y de índigo por hectárea durante el cultivo de plantas de añil.....	74
II.15. Representación esquemática del ciclo de cultivo de añil en la que se indican cada una de las etapas del crecimiento y producción relacionadas con la edad de la planta y el mes en el que se presentan.....	75
III.1. Corte transversal de hoja de añil en el que se observan los diferentes tejidos. Ampliación lente a 20 X.....	78
III.2. Corte transversal de la región central de la hoja de añil en la que se observa el tejido de la nervadura principal. Ampliación lente a 40X.....	79
III.3. Detalle de un corte transversal de hoja de añil en el que se observa la capa de color rojo que divide al parénquima en empalizada del esponjoso. Ampliación lente a 40X.....	80
III.4. Corte transversal de la hoja de añil realizado en forma manual. Ampliación lente a 10X.....	80
III.5. Corte transversal de hojas de añil tratadas con amoníaco e inclusión en PEG. Ampliación lente a 10 X.....	82

III.6. Corte transversal de hojas de añil tratadas con amoníaco e inclusión en PEG. Ampliación lente a 40 X.....	82
III.7. Cortes transversales de hojas de añil, tratados con amoníaco y etanol e incluidos en PEG. (A)Vista general del corte, ampliación lente 10X. (B) Sección de nervadura, ampliación lente 20X. (C) y (D) Nervadura y sección de hoja, ampliación lente 40 X.....	85
IV.1. Oscurecimiento de hojas de añil durante el transporte y almacenamiento...	89
IV.2. Extracción de CAP en muestras de hojas de añil frescas y secadas al sol.....	91
IV.3. Resultados del análisis estadístico de CAP obtenido durante el experimento de secado. (1) Muestras frescas; (2) Muestras secas.....	92
IV.4. Concentración de índigo en el CAP obtenido por extracción de (1) hojas frescas y (2) hojas secas.....	93
IV.5. Análisis estadístico de la concentración de índigo en el CAP obtenida durante el experimento de secado.....	93
IV.6. Micrografía de la superficie de la hoja de añil en la que se observa la apariencia de los tricomas.....	94
IV.7. Comparación estadística de la concentración de CAP en hojas de añil tamizadas y sin tamizar.....	96
IV.8. Comparación estadística de la concentración de índigo en el CAP extraído de muestras tamizadas y sin tamizar.....	97
IV.9. Comparación estadística de la concentración de índigo en muestras de hojas deshidratadas de añil tamizadas y sin tamizar.....	98
IV.10. Efecto de la relación MP/S utilizada en la extracción de CAP a partir de hojas de añil.....	99
IV.11. Análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos de extracción a diferentes relaciones MP/S.....	100
IV.12. Reactor de vidrio de 8 litros utilizado en la extracción de añil.....	101
IV.13. Resultados del rendimiento de CAP a diferentes tiempos de extracción.....	102
IV.14. Análisis de varianza y comparación de medias del rendimiento de CAP a diferentes tiempos de extracción.....	103
IV.15. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 25 ° C.....	105
IV.16. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 35° C.....	105

IV.17. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 45° C.....	106
IV.18. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 60° C.....	107
IV.19. Concentración obtenida de CAP a diferentes valores de pH de extracción	108
IV.20. Concentración obtenida de índigo a diferentes valores de pH de extracción.....	108
IV.21. Análisis de varianza del rendimiento de CAP a diferentes pH.....	109
IV.22. Análisis de varianza del rendimiento de índigo a diferentes pH.....	110
IV.23. Evolución del pH respecto del tiempo durante la extracción de colorantes en plantas de añil.....	111
IV.24. Cambios en el contenido de índigo (medido como absorbancia) en los extractos de añil a medida que evoluciona el pH del medio: (a) pH inicial = 2; (b) pH inicial = 12.....	111
IV.25. Efecto del tiempo de aireación sobre el rendimiento de CAP.....	112
IV.26. Análisis estadístico del efecto del tiempo de aireación sobre el rendimiento de CAP.....	113
IV.27. Rendimientos de CAP obtenidos a diferentes valores de pH de aireación .	114
IV.28. Rendimientos de índigo a diferentes pH de aireación.....	115
IV.29. Esquema del equipo de 2 litros utilizado en la extracción de añil asistida por ultrasonido.....	119
IV.30. Evolución de la temperatura durante la extracción asistida por ultrasonido utilizando diferentes pH.....	120
IV.31. Evolución del pH durante la extracción asistida por ultrasonido de colorantes de añil.....	120
IV.32. Rendimientos de CAP obtenidos durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas secas de añil. La línea roja representa los niveles obtenidos en el tratamiento testigo extraído durante 6 h a 28° C.....	121
IV.33. Comparación de medias de los rendimientos de CAP en diferentes tratamientos de extracción con ultrasonido. Método de diferencia mínima significativa. $\alpha = 0.05$.....	122
IV. 34. Aspecto de las muestras de CAP disueltas en DMF (a 250 ppm). Muestras extraídas con ultrasonido a diferentes pH.....	123
IV.35. Rendimientos de CAP obtenidos durante la extracción asistida por	

ultrasonido de hojas secas de añil. La línea roja representa los niveles obtenidos en el tratamiento testigo extraído durante 6 h a 28° C.....	124
IV.36. Comparación de medias de los rendimientos de índigo en diferentes tratamientos de extracción con ultrasonido. Método de diferencia mínima significativa. $\alpha = 0.05$	126
IV. 37. Rendimientos de indirrubina obtenidos durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas secas de añil. La línea roja representa los niveles obtenidos en el tratamiento testigo extraído durante 6 h a 28° C.....	127
IV.38. Gráfica de interacciones de los factores de extracción de indirrubina realizada con ultrasonido. ($\alpha = 0.05$).....	128
IV.39. Esquema del equipo de 30 litros utilizado en la extracción de añil asistida por ultrasonido.....	129
IV.40. Extracción de añil en equipo de ultrasonido de 30 L.....	129
IV.41. Rendimientos de CAP obtenidos a diferentes tiempos utilizando el equipo de extracción con ultrasonido de 20 L. La línea roja punteada representa el rendimiento obtenido en el tratamiento testigo: sin ultrasonido, 6 h, 28° C.....	130
IV.42. Rendimientos de índigo obtenidos a diferentes tiempos utilizando el equipo de extracción con ultrasonido de 20 L. La línea roja punteada representa el rendimiento obtenido en el tratamiento testigo: sin ultrasonido, 6 h, 28° C.....	131
IV.43. Evaluación de extracción con ultrasonido en el equipo de 30 L	132
IV.44. Evaluación de extracción con ultrasonido en el equipo de 30 L utilizando como solvente una solución tampón a pH 12 solvente una solución tampón a pH 7.....	133
V.1. Método general de extracción de colorantes en plantas de añil.....	136
V.2. Procedimiento general de extracción con ultrasonido de colorantes de plantas de añil.....	137
V.3. Cromatograma de índigo obtenido durante la lectura en el densitómetro	140
V.4. Curva de calibración de índigo. En la gráfica se observa la posición de una muestra de CAP obtenido de plantas de añil depositada dos veces en la	

misma placa.....	141
V.5. Determinación de índigo por espectrofotometría. Procedimiento utilizado para la disolución de muestras de CAP.....	142
V.6. Determinación de índigo por espectrofotometría. Curva de calibración a 600 nm.....	142
V.7. Cromatograma de indirrubina obtenido durante la lectura en el densitómetro.....	143
V.8. Curva de calibración de indirrubina. En la gráfica se observa la posición de una muestra de CAP obtenido de plantas de añil depositada dos veces en la misma placa.....	144
V.9. Curva de calibración para determinación de taninos.....	145

INDICE DE TABLAS

I.1. Especies vegetales productoras de índigo.....	28
II.1. Velocidades de crecimiento en campo de cultivos de añil.....	64
II.2. Análisis de varianza del rendimiento de CAP a diferentes fechas de cosecha	69
II.3. Análisis de varianza del rendimiento de índigo a diferentes fechas de cosecha.....	72
IV.1. Efecto del tamizado sobre el rendimiento de CAP e índigo extraídos de hojas de añil.....	95
IV.2. Análisis de varianza de efecto del pH y el tiempo de extracción sobre los rendimientos de CAP ($\alpha = 0.05$).....	121
IV.3. Concentración de índigo en el CAP obtenida al variar el pH y el tiempo de extracción con ultrasonido.....	124
IV.4. Análisis de varianza del efecto de pH y el tiempo de extracción con ultrasonido sobre los rendimientos de índigo en hojas secas de añil ($\alpha = 0.05$).....	125
IV.5. Análisis de varianza del efecto de pH y el tiempo de extracción con ultrasonido sobre los rendimientos de indirrubina en hojas secas de añil ($\alpha = 0.05$).....	127
VI.1. Cantidad y concentración de soluciones madre utilizadas en la preparación de soluciones tampón a diferentes valores de pH.....	138

INTRODUCCIÓN

El índigo es un colorante conocido por los hombres desde la antigüedad: Se usaba como colorante textil desde el año 2000 aC (Bouchilloux et Roche, 1955; Edmonds, 1989; Clark *et al*, 1993). Hasta el siglo XIX el índigo se obtenía principalmente de plantas del género *Indigofera*, las cuales estaban ampliamente distribuidas en África, India y las islas del Este y Sudamérica. Con la llegada de la revolución industrial a Europa y Norteamérica la demanda de colorante azul se incremento hasta que llegó a ser uno de los principales artículos en el comercio entre Europa y el Occidente.

En 1883, Alfred von Baeyer identificó la estructura química del índigo y en 1887 se desarrolló el primer proceso químico de manufactura. Con el tiempo el índigo sintético desplazó casi en su totalidad la producción de índigo natural (Kokubun *et al*, 1998, Murdock, 1994, Oberthür *et al*, 2004).

En la actualidad, el índigo se usa principalmente para el teñido de textiles tales como el algodón que se emplea en la elaboración de la mezclilla y en la preparación de sustancias para aplicación en artes y en farmacia. Recientemente se ha reportado su uso en procesos de captación de energía solar (Ensley and Burt, 1985). Por otra parte, el derivado 5,5'-disulfonado del índigo (índigo carmín), un colorante de color azul se utiliza en alimentos (Mark and Ho, 1995).

La producción anual de índigo sintético en el 2001 se estimó en 22,000 toneladas (Bechtold *et al*, 2002). El proceso de síntesis química involucra múltiples pasos de extracción en los que se libera una gran cantidad de subproductos, muchos de ellos tóxicos. Esto representa un problema ambiental en la mayoría de los países donde se produce (Goto *et al*, 1996; Murdock, 1994; Mark and Ho, 1995).

Debido a la importancia del índigo y a los cambios en los patrones actuales de consumo con preferencia en los productos naturales, se ha incrementado la atención hacia la búsqueda de alternativas de producción que reemplacen el proceso de síntesis química (Bechtold, 2002).

Como resultado de la desaparición histórica del cultivo de las especies vegetales productoras de índigo en la actualidad se conoce poco sobre las bases químicas, bioquímicas y de proceso que regulan la producción de este colorante que alguna vez fue una industria muy importante (Kokubun *et al*, 1998). La producción eficiente y ecológica de índigo natural, requiere entre otras cosas información detallada acerca de la

dependencia del tiempo de cosecha del cultivo, de las condiciones de almacenamiento del material vegetal, así como de la extracción de los precursores y la formación del colorante final (Bechtold, 2002).

En Centroamérica y en las regiones tropicales de México el añil se conocía y se procesaba desde la época prehispánica para el teñido de indumentarias y en las ceremonias religiosas (Barrera y Ramírez, 2002). En la época colonial se exportaban grandes cantidades de este producto a Europa. En Centroamérica, el añil fue parte importante de las exportaciones durante muchos años. Sin embargo, en la actualidad la producción está restringida a pequeñas regiones rurales en las que la mayoría de las operaciones de cultivo y procesamiento se hacen en forma artesanal, utilizando conocimientos que se han transferido de generación en generación, con operaciones muy laboriosas y en periodos muy largos. La falta de conocimientos sobre el proceso repercute en bajos rendimientos en campo y durante el procesamiento y consecuentemente en bajas ganancias para los productores. Asimismo, las variaciones en concentración final de índigo y en la calidad del colorante dificultan su comercialización.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la producción de colorante natural azul en plantas de añil durante el ciclo de cultivo, con la finalidad de determinar la influencia de la etapa de cosecha, así como el efecto de las condiciones de extracción de los colorantes sobre los rendimientos y las características del producto final.

En el primer Capítulo se presenta un estudio bibliográfico sobre las características de las plantas del género *Indigofera*, su distribución geográfica y sus principales usos. Posteriormente, se aborda la descripción del índigo natural, describiendo su importancia histórica, las diferentes fuentes de obtención, la bioquímica de su producción y los métodos que se utilizan para su extracción. Se incluye también una breve descripción sobre la producción de índigo sintético para terminar con algunos aspectos relacionados con la extracción de metabolitos con ayuda de ultrasonido.

El Capítulo II se dedica a los resultados obtenidos durante el cultivo en campo de las plantas de añil. Se contempla la selección del terreno, la germinación de las semillas y la evaluación durante el ciclo de cultivo del crecimiento, la producción de colorante y la producción de índigo.

El Capítulo III se consagra a los estudios histológicos y citológicos de las hojas de añil con la finalidad obtener información acerca de la estructura interna de los tejidos y de la acumulación de precursores dentro de las hojas.

Los Capítulos IVA y IVB están enfocados a los resultados obtenidos en la evaluación de las condiciones de extracción y su efecto sobre los rendimientos de colorante así como la composición del mismo. En el Capítulo IVA se describe el efecto del pretratamiento, el tiempo de extracción, la temperatura, la relación P/V de extracción, y el pH. En tanto que el Capítulo IVB se centra en los resultados obtenidos durante la extracción asistida por ultrasonido a diferentes condiciones.

En el Capítulo V se presenta la descripción de los principales procedimientos analíticos utilizados en este trabajo.

Al final del trabajo se hace referencia a las conclusiones finales, la bibliografía utilizada a lo largo del trabajo y la documentación anexa que sirve de complemento a la información presentada en los capítulos anteriores.

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INDICE DE CONTENIDO

I.1. El género *Indigofera*

I.1.1. Descripción botánica

I.1.2. Condiciones de cultivo

I.1.3. Usos de las plantas

I.1.3.1. Especies tinctorias del género *Indigofera*

I.1.3.2. Aplicaciones medicinales

I.1.3.3. Usos alternativos

I.2. El índigo natural

I.2.1. Antecedentes de la producción de índigo natural

I.2.2. Especies vegetales productoras de índigo

I.2.3. La ruta de biosíntesis de índigo en plantas

I.2.3.1. Precursores de la formación de índigo en plantas

I.2.3.2. Hidrólisis y oxidación del indicán

I.2.3.3. Biosíntesis de indicán

I.2.4. Composición del índigo

I.2.5. Procesos de extracción de índigo a partir de plantas

I.2.5.1. Extracción de plantas de añil

I.2.5.2. La extracción del colorante en plantas de pastel

I.2.6. Usos del índigo y la indirubina

I.4. Alternativas de producción de índigo natural

I.4.1. Cultivo *in vitro* de plantas

I.4.2. Producción microbiana

I.5. El índigo sintético

I.5.1. Antecedentes históricos

I.5.2. Procesos de síntesis

I.6. Extracción de metabolitos empleando ultrasonido

I.7. Bibliografía

CAPITULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1. El género *Indigofera*

I.1.1. Descripción botánica

El género *Indigofera* comprende 250 especies tropicales y subtropicales repartidas en toda la superficie terrestre, principalmente al sur y centro de África. Este género se agrupa dentro de la siguiente clasificación botánica (Barrera y Ramírez, 2003; Sánchez, 1984):

Subdivisión : Angiospermae

Clase: Dicotiledónea

Orden: Rosales

Familia: Leguminosae

Subfamilia: Papilionoidae

Tribu y subtribu: Galeagas indigoferinas

La subfamilia Papilionoidae algunas veces es considerada como la familia botánica *Papilionaceae* Giseke (USDA, 2005).

Las plantas del género *Indigofera* son herbáceas, anuales ó perennes ó pequeños arbustos con hojas imparipinadas de 5 o más foliolos cubiertos de pelos o tricomas y flores rojizo-purpúreas agrupadas en racimos apretados. Las flores tienen cáliz de 5 dientes lanceolados o tubulados, subyúgales o los inferiores más largos. El estandarte es persistente, ovado o orbicular, alas oblongas ligeramente unidas a la quilla, caedizas con ella. Estambres diadelfos, el superior libre desde la base, anteras uniformes con el conectivo apiculado. Ovario sésil o subsésil con varios óvulos. Legumbre linear, recta o curva, septada entre las semillas (Martínez, 1979; Sánchez, 1984). Algunas de las especies del género *Indigofera* son resistentes a las heladas. Para su desarrollo requieren exposición a pleno sol y suelos fértiles y bien drenados (Brickell, 1996).

Rossignon (1884) describió a las especies tintóreas de este género de la siguiente manera:

“Son arbustos de dos y medio a tres pies de elevación, su tallo es sub-leñoso, derecho, bastante ramificado, de ramillas enderezadas, lampiñas, de un verde glauco algo pálido.

Las hojas son alternas imparipinadas, pediculadas, compuestas de nueve a once hojuelas (algunas veces más), con pedículos cortos, elípticas, alargadas, redondeadas en la cima y casi siempre mucronadas, enteras, de un verde blanquizco en su superficie inferior o cubiertas de una pubescencia fugaz. En la base de cada hoja hay dos estípulas subuladas. Las flores, de un rojo o amarillas mezclado con un poco de verde, forman en la axila de las hojas superiores espigas o racimos simples mucho más cortos que estas hojas y cuyas flores son pediceladas enderezadas. Las vainas que suceden a estas flores, son casi cilíndricas, encorvadas en figura de hoz, largas de seis a diez líneas, terminadas en una pequeña punta mucronada. Son ligeramente pubescentes al estado tierno, lampiñas y marcadas en la edad adulta por una lista longitudinal un poco saliente en cada una de sus suturas; encierran ordinariamente cinco o seis semillas angulosas y morenuzcas”.

I.1.2. Condiciones de cultivo

El cultivo de las *Indigoferas* requiere un clima suficientemente húmedo o un sistema de irrigación, el clima propicio debe ser cálido subhúmedo con lluvias en verano. Las temperaturas deben oscilar entre los 24.6 y 27.6°C durante todo el año. El añil requiere una precipitación pluvial anual de entre 900 a 2250 mm, la cual debe distribuirse durante los meses de junio a septiembre (Thomas, 1998; Ku, 1997).

La tierra debe ser rica y bien laboreada (Thomas, 1998). Los suelos que son adecuados para el añil deben contener entre 6 y 8% de materia orgánica y poseer una capacidad de intercambio cationico de 15 a 20 meq/100 g. La solución del suelo debe presentar un valor de pH entre 6 y 7, es decir, entre neutro a ligeramente ácido. La textura del suelo adecuada para lograr un buen cultivo de añil debe ser limosa, ya que los suelos arenosos y arcillosos no brindan las condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas (Ku, 1997).

Si la planta se siembra en primavera, la floración se presenta 3 meses después, las hojas que encierran el precursor del índigo (el indicán) se vuelven ligeramente violáceas. Se dice que es en este momento cuando hay mayor cantidad de indicán. La planta permite realizar hasta tres cosechas al año. Los rendimientos obtenidos oscilan entre 22 y 55 kg de colorante por hectárea según la calidad del terreno explotado y las condiciones climáticas (Thomas, 1998).

1.1.3. Usos de las plantas

1.1.3.1. Especies tintorias del género *Indigofera*

Las principales especies cultivadas de este género son *Indigofera arrecta* Hosch, *Indigofera suffruticosa* Mill (*Suffruticosa* y *Guatemalensis*), *Indigofera tinctoria* L. e *Indigofera argentea* L. (Figura I.1). Estas especies prefieren para su desarrollo las regiones tropicales de Asia, África y América (Thomas, 1998).

La especie más conocida es la *Indigofera tinctoria* L. la cual tuvo como centro geográfico de origen la India. Se le conoce como “planta verdadera del índigo”; se trata de una planta bianual de porte alto, de 60 cm a un metro de altura, de tallo único, recto, cilíndrico, de un grosor de 1 centímetro de diámetro en promedio. Las hojas son compuestas, alternas, y poseen en la base estípulas angostas y triangulares: poseen de siete a doce folíolos ovales en disposición opuesta, redondeados en su base y glabros. Sus flores son pequeñas de 5 mm de largo, de color rosa violáceo que están agrupadas en racimos que nacen en las axilas de las hojas. Los frutos son vainas cilíndricas que cuelgan, ligeramente curvas y glabras (Cardon et Chatenet, 1990). Sigue siendo cultivada en la India, China, en los países del Este y en América, donde fue introducida en el siglo XVI por los conquistadores europeos (Matadamas-Ortiz, 2002).

Indigofera suffruticosa Mill es la especie americana que se ha utilizado desde tiempos precolombinos en el sur de México y Centroamérica como fuente de índigo natural hasta nuestros días. El colorante obtenido de esta especie se conocía y se procesaba para teñir indumentarias y en las ceremonias rituales. También se conoce su uso como pigmento en los murales de los templos Mayas, Toltecas y Olmecas, fue una de las materias primas para la elaboración del enigmático colorante conocido con el nombre de “Azul maya” (Matadamas-Ortiz, 2002).

En cada zona específica se le identificó con un nombre en la lengua local ch’oh en maya de Yucatán, jiquilite en Oaxaca y Chiapas, tzitzupu en Michoacán, predominando el nombre náhuatl de xiuhquilitl que deriva de las raíces xihuite, y quilitl que significan hierba azul (Barrera y Ramírez, 2003).

Cuando los españoles conocieron las plantas del jiquilite lo confundieron con las de las especies de *Indigofera añil*, originaria de la India, que para entonces ya se cultivaba en Europa y a partir de entonces las denominaciones locales fueron desplazadas por el nombre de añil (Barrera y Ramírez, 2003).



Figura I.1. Principales especies del género *Indigofera*. (1) *Indigofera tinctoria* L. (2) *Indigofera arrecta* Hoschst. (3) *Indigofera suffruticosa* Mill. Sbsp *suffruticosa*. (4) *Indigofera argentea* L. (5) *Indigofera suffruticosa guatemalensis* de Kort y Thijise (Thomas, 1998)

El cultivo del jiquilite y su procesamiento fueron la columna vertebral del sector de exportación de la economía centroamericana a finales del periodo colonial. Aunque otros productos aparecen en los registros, el añil fue la mercancía más voluminosa y valiosa (Fernández MJA, 2003). En la nueva España (México) se producían tres colorantes importantes para la industria textil: la grana cochinilla, el palo de tinte y el añil, que se destinaban a la exportación a España (y España lo distribuía al resto de Europa) mediante el comercio legal o contrabando, en conjunto estos tres colorantes llegaron a ser la segunda materia prima de exportación de la Nueva España en valor, después del oro y la plata (Barrera y Ramírez, 2003).

Las principales zonas productoras de añil en México se encontraban en los estados de Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Morelos, Puebla, Colima, Chiapas, Tabasco y Yucatán. Actualmente, se cultiva en Oaxaca, Jalisco y Michoacán.

El añil comprende dos subespecies *Indigofera suffruticosa* Mill, *ssp suffruticosa* e *I. suffruticosa* Mill *ssp. Guatemalensis* que crecen en el sur y sudeste de México, Guatemala, El Salvador y Perú.

Indigofera suffruticosa Mill *ssp suffruticosa* es una planta arbustiva semiperenne de 45 a 240 cm de altura, su ciclo de vida es de cuatro años. Su raíz es pivotante, poco profunda, de longitud de 40 a 60 cm. Cuenta con raíces secundarias en toda su extensión, además de nódulos nitrificantes. Sus hojas poseen estipulas triangulares de 3 a 6 cm de longitud. Caquis de 5 a 10 cm de largo, presenta entre siete a quince foliolos opuestos, ligeramente elípticos u ovalados, ápice agudo o redondeado, micrón de 0.5 mm, son glabros o con poca pubescencia, las nervaduras son visibles. Las flores están dispuestas en racimos de 2 a 6 cm de longitud con brácteas triangulares, pedicelos de 0.5 a 1.0 mm de largo. Las florecillas son de 4 a 5 mm, de color rosa-salmón a rojo; la copa del cáliz es de 2 mm de diámetro, el estandarte es ovado a orbicular. Los frutos son vainas descendentes, ligeramente curvadas de 1.5 cm de longitud por 2 mm de ancho, son pubescentes, con cuatro a siete semillas en su interior de forma cunicular (Ku, 1997).

I. suffruticosa Mill *ssp guatemalensis* es también conocida como jiquilite y crece en Guatemala, El Salvador, las Islas de las Indias Occidentales, Ecuador y Perú. Se distingue de la subespecie *suffruticosa* por sus vainas rectas, ligeramente pubescentes que terminan en forma de pico. Es una planta de talla pequeña que puede crecer entre 40 a 50 cm de altura. De la base generalmente nace un solo tallo semileñosos que después se ramifica en tres a cuatro ramas principales que conforman la estructura principal. Las hojas poseen entre 5 a 10 foliolos ovalados y sus flores son de color rojo claro (Matadamas-Ortiz, 2002).

Indigofera arrecta Hoscht, es una especie nativa de Etiopía que se cultiva en África. Es muy parecida a *I. tinctoria* y se caracteriza por tener flores de color verdoso. Fue introducida a Java hacia 1860 y luego pasó a la India en donde se le conoce como Índigo de java. Se considera como una especie con un alto contenido de precursor y que tiene buen rendimiento de índigo.

La especie *Indigofera argentea* es considerada como el indigotier de Egipto y de Abisinia, es una especie nativa del noroeste de la India que fue llevada a África probablemente en una época muy antigua, donde fue cultivada principalmente en África del norte y Yemen.

Existen otras especies como *Indigofera heterantha* (también conocida como *Indigofera gerardiana*), la cual prospera en regiones templadas (Matadamas-Ortiz, 2002).

I.1.3.2. Aplicaciones medicinales

Los remedios herbolarios usados en la medicina tradicional proveen una fuente interesante y poco explorada para la creación y desarrollo potencial de nuevas drogas que se utilizan en quimioterapia, las cuales pueden ayudar a reducir los problemas de resistencia y también de toxicidad de los medicamentos comerciales. Los métodos medicinales tradicionales podrían jugar un papel vital para cubrir las necesidades básicas de salud en los países en desarrollo. En la actualidad existe un gran interés en evaluar el potencial de diferentes plantas y en validar el uso de la medicina tradicional con la finalidad de revelar los principios activos por aislamiento y caracterización de sus constituyentes (Awadh et al, 2001).

Las especies del género *Indigofera* se han utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades en los países de donde ellas son originarias.

El jugo de las hojas de la especie *Indigofera dendroides* Jacq se utiliza en medicina tradicional en las regiones del este de África para el tratamiento de llagas e inflamaciones severas. También se ha reportado su uso en el tratamiento de infecciones de la piel y para el lavado de la garganta (Amos et al, 2003; Esimone et al, 1999). Un estudio reciente, realizado con ratones y preparaciones del músculo liso de ratas y puercos de Guinea reveló que los extractos de hojas de la especie *I. dendroides* a concentraciones de 0.05 a 3.2 mg/L promueven la contracción del músculo liso, mediante la movilización muscular del calcio, atribuyendo a esto su actividad biológica (Amos et al, 2003). Asimismo, Esimone et al, 1999, demostraron las propiedades antimicrobianas de los extractos acuosos, metanólicos y etéreos de la misma especie encontrando alta efectividad contra las especies de bacterias y

hongos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

Existen reportes sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de otras especies del género *Indigofera*. En un estudio reciente realizado con la especie *Indigofera oblongifolia* se encontró que los extractos acuosos y etanólicos tienen alta efectividad contra el desarrollo de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Awadh *et al*, 2001). Por otra parte, las proteínas y péptidos de bajo peso molecular de los extractos de hoja de la especie *Indigofera oblongifolia* obtenidos por fraccionamiento en una columna cromatográfica Sephadex G-25 mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram(+) y Gram (-) y algunas especies de hongos (Umar, 1999).

El potencial como agente anticancerígeno de la especie *Indigofera aspalathoides* Vahl, comúnmente conocida en la India como “Shinavar vembu”, se evaluó en linfomas de ratones albinos Suizos, encontrándose un incremento en su ciclo de vida, una disminución en el conteo de células cancerosas y un incremento en el peso corporal, demostrando que esta planta tiene un efecto protector contra algunos tipos de cáncer (Christina *et al*, 2003).

La especie *Indigofera arrecta* se usa en medicina tradicional en Ghana para el tratamiento de la *Diabetes mellitus*. Hasta ahora, ningún efecto adverso se ha reportado en el uso de esta planta. Sus propiedades antidiabéticas se han demostrado en humanos y en estudios con ratas (Nyarko *et al*, 1993). Diferentes reportes indican que los remedios herbales pueden contener químicos tóxicos (McLean, 1970). Bajo esta consideración, se realizó un estudio sistémico para evaluar la seguridad del uso de los extractos vegetales de la especie *I. arrecta* en humanos voluntarios. Los resultados de este trabajo muestran que no existen reacciones tóxicas que puedan afectar el estatus inmune de los usuarios (Sittie and Nyarko, 1998).

Los extractos de la especie *Indigofera longeramosa* se utilizan como antídoto para todo tipo de venenos de serpientes. A partir de los tallos de esta especie se han aislado compuestos diterpenoides y Xanteños los cuales pueden usarse en aplicaciones medicinales. El diterpenoide al cual han llamado “Indigoferabietona” mostró actividad antituberculosa cuando se probó con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* y *Escherichia coli* (Thangadurai *et al*, 2001, 2002).

En la India, la especie *Indigofera tinctoria* Linn se utiliza ampliamente para el control de la epilepsia, los desordenes nerviosos, la bronquitis y los problemas del hígado. En estudios recientes se encontró que la “Indigtona”, una sustancia bioactiva obtenida por

fraccionamiento de un extracto de la parte aérea de la planta con éter de petróleo, tiene actividad hepatoprotectora contra daños al hígado inducidos por CCl₄ (Sing *et al*, 2001).

Los indígenas americanos conocían y utilizaban el añil desde los tiempos precoloniales y lo llamaban Mahutli o acehoitli, empleándolo como colorante y como medicina. Usaban las semillas pulverizadas para el tratamiento de las enfermedades urinarias y para las úlceras. En México se empleaban los extractos de la especie *Indigofera suffruticosa* en la medicina tradicional. Con las hojas se hacían cataplasmas o cocimientos que se aplicaban para calmar el dolor y el calor excesivo de la cabeza de los niños y con el polvo de las semillas curaban las úlceras y lo utilizaban como insecticida para los piojos. Lo recomendaban también como antiespasmódico, sobre todo en el tratamiento de la epilepsia, contra los cólicos intestinales y la locura. También se ha usado como diurético, En Brasil hasta la fecha, es uno de los remedios más populares contra la mordedura de serpientes, pero probablemente ineficaz (Martínez, 1979).

I.1.3.3. Usos alternativos

Las especies del género *Indigofera* se utilizan para la alimentación humana y como forrajes para el ganado. Algunas tribus de la India utilizan las semillas de la especie *Indigofera linifolia*. Un estudio realizado por Siddhuaraju *et al*. (1995), reveló que estas semillas tienen alto contenido de proteínas, principalmente albúminas y globulinas, son ricas en K, Ca, Mn y Cu, y contienen una gran proporción de ácidos grasos insaturados entre los que destaca el ácido linoleico. La digestibilidad de estas semillas fue superior al 70%. Por otra parte, la especie *Indigofera spinosa* (Forsk) es una fuente forrajera clave en las regiones áridas del Norte de Kenya donde viven los pastores nómadas. Su sabor es muy apreciado por el ganado (Keya, 1997).

En Filipinas, se evaluó el efecto del cultivo intercalado la especie *Indigofera tinctoria* sobre los rendimientos de cultivos de arroz-tomate, arroz-tabaco, arroz-maíz y arroz ajo durante la temporada de sequía. Posteriormente se utilizaron los cultivos de *Indigofera* como abono verde para los cultivos de arroz durante la temporada de lluvias. En este trabajo se encontró que el cultivo intercalado no afecta los rendimientos, pero la utilización de las plantas como abono verde tuvo un efecto positivo sobre los cultivos de arroz, obteniéndose mejores rendimientos que los obtenidos al utilizar fertilización química con urea (Agustín *et al*, 1999).

Las plantas de género *Indigofera* pueden utilizarse potencialmente en la regeneración de suelos degradados de las regiones áridas (Sy *et al*, 2001) y como leña para usos caseros (Barrios, 2004).

I.2. El índigo natural

I.2.1. Antecedentes de la producción de índigo natural

El índigo es conocido desde la antigüedad. Los egipcios lo utilizaron para el teñido de telas. Entre los romanos este colorante se consideraba el segundo en importancia después del púrpura. Ellos conocían que provenía de la India pero suponían que se formaba sobre la superficie del mar y se depositaba en ciertas regiones donde era recogido por los nativos. Hasta el siglo XII el índigo era una mercancía rara en Europa debido a que la mayor parte provenía de la India vía Siria y Alejandría y el costo de transportarlo era muy caro. En este periodo las especies del género *Indigofera* spp constituyeron la fuente principal del índigo, comercializado en el mundo, y su cultivo estaba restringido a las condiciones ambientales cálidas debido a que los intentos realizados para adaptarlos a las condiciones de Europa occidental habían fallado (Clark *et al*, 1993, Rossignon, 1884).

En Europa medieval el índigo se extraía de las plantas del pastel (*Isatis tinctoria*). Hay indicios de que se cultivaban desde principios del periodo Neolítico (Kokubun, 1998). En las Islas Británicas la población nativa procesaba el pastel y teñía sus cuerpos con el colorante obtenido. Posteriormente, como consecuencia de la invasión romana a esta región los conocimientos acerca de este colorante llegaron a Italia, donde se perfeccionaron los métodos de extracción y teñido. Con la caída del Imperio Romano, muchas actividades se detuvieron incluidas las relacionadas con el teñido, provocando el abandono del cultivo del pastel, aunque el legado de conocimientos no se perdió para siempre (Clark *et al*, 1993).

El renacimiento de la industria del pastel durante la edad media se debió a la introducción por parte de los árabes de nuevas materias colorantes y técnicas de tinción desconocidas en el oeste, así como al incremento en la actividad industrial. Durante los siglos XIV y XV se desarrollaron grandes regiones productoras de este colorante en Francia, Italia, Inglaterra y Alemania (Oberthür *et al*, 2004).

Durante el siglo XVI los marineros alemanes iniciaron el comercio con la India y empezaron a importar índigo proveniente de las especies de *Indigofera*. Este producto poco a poco fue desplazando al pastel. En 1631 se importaron a Holanda 333,545 libras

(151,296 kg) del colorante proveniente de la India. Con la expansión colonial el índigo comenzó a llevarse a Europa desde diferentes partes del mundo, especialmente desde Centro y Sudamérica, Madagascar y la India (Clark *et al*, 1993). En 1806 Inglaterra importó 2200 toneladas con un valor de 2 millones de libras y en 1897 la India exportó 19,000 toneladas del colorante.

Aunque el índigo llegó a convertirse en el colorante más utilizado para teñir de azul, su uso generalizado por parte de los tintoreros europeos fue la consecuencia de un proceso lento, pues debió superar intereses creados y concepciones erróneas. Los importadores de añil del siglo XVI encontraron una fuerte oposición entre los productores europeos de pastel y los mercaderes que controlaban el financiamiento y distribución de este colorante europeo, lo que se reflejó en la promulgación de decretos que prohibían el uso del añil. casi todos los países aprobaron edictos que convertían la importación y uso del añil en un delito penal que se podía castigar con la muerte. El aumento de la oferta del tinte generó envidia y celos de los tintoreros de negro, el color de moda, debido a que se estaba utilizando el añil para obtener el color negro. La presión afectó hasta a la Iglesia católica y el Papa Pío V declaró que el azul no era un color eclesiástico (Fernández, 2003).

A finales del siglo XVI y principios del XVII, las características del colorante y la organización de compañías comerciales patrocinadas por los gobiernos de Inglaterra y los Países Bajos consiguieron darle un lugar importante al intercambio comercial de índigo entre Europa y la India. Sin embargo, a principios del siglo XVII los tintoreros experimentaron con sosa cáustica para disolver el colorante, lo que provocó algunas muertes entre los trabajadores. Estos accidentes, consecuencia de la ignorancia generalizada sobre los efectos letales de la recién descubierta sosa, fueron usados hábilmente por los comerciantes de pastel para obtener nuevas leyes que prohibieran el uso del añil. Fue así como Enrique IV de Francia impuso la pena de muerte en 1609 contra quien fuera descubierto usando “el tinte del demonio”. A pesar de eso en 1613 se importó añil de Alejandría a través de Marsella. Isabel I de Inglaterra aprobó una prohibición similar, a pesar de que los productores de pastel eran mucho menos poderosos que sus contrapartes en el continente, esta prohibición fue revocada por Carlos II en 1660 para permitir que la compañía Inglesa de la Indias Orientales pudiera importarlo, aunque hacía décadas que lo importaba (Fernández, 2003).

Cuando los británicos y holandeses reemplazaron el antiguo monopolio portugués en el Lejano oriente, el abastecimiento del añil producido en Asia controló el mercado europeo durante un breve periodo. El tinte de la india fue la mercancía más valiosa de los diez y

ocho barcos que llegaron a Londres desde Indostán en el periodo 1614-1629. A finales del siglo XVII el comercio del añil asiático comenzó a disminuir como consecuencia de la adulteración, los altos precios y los defectos en el empaque para su transporte, pero principalmente debido a la competencia del añil proveniente de las colonias francesas e inglesas recién adquiridas en el Nuevo Mundo Tropical (Fernández, 2003).

El añil de la India siguió llegando al mercado europeo en pequeñas cantidades durante la segunda mitad del siglo XVII, pero para entonces constituía sólo una fracción del comercio euro-asiático y no podía competir con el colorante producido en América.

Aunque se ha especulado acerca de si el cultivo del añil fue llevado de Europa hacia América, la mayoría de los autores coinciden en la opinión de esta planta ya se conocía en el nuevo mundo. Las primeras noticias acerca del uso del añil, mencionan que los primeros viajeros que penetraron en América notaron que los pueblos de esas comarcas se pintaban el cuerpo con una materia azul que extraían de una planta análoga a la *Indigofera* pero desconocían la identidad de esta planta (Rossignon, 1888). Por otra parte, Fray Bernardino de Sahagún en su obra “La historia general de las cosas de la Nueva España”, menciona que había una hierba en las tierras calientes llamada *xiuhquilitl* de la que se obtenía un colorante que teñía de azul oscuro y resplandeciente (Anónimo, 1999).

Se tienen evidencias de que el añil fue utilizado para la fabricación del azul maya, un colorante con una alta resistencia a la luz y a los ácidos y que fue elaborado para pintar los murales de los templos mayas y de otras civilizaciones de México y Guatemala (Littman, 1980, Yacamán and Serra Puche, 1995).

Durante la colonia los españoles introdujeron obrajes para teñir, construyeron cubas para precipitar el añil y perfeccionaron las técnicas del teñido, al mismo tiempo que organizaron los procesos de producción y el comercio sobre la base del tributo y la producción forzada (Matadamas-Ortiz, 2002).

Los colorantes índigos provenientes de América se clasificaban de acuerdo a su procedencia y calidad, se consideraba que los mejores eran los provenientes de Guatemala (que incluía la provincia de el Salvador y Nicaragua) y en seguida los de México y Caracas (Rossignon, 1884).

La producción de añil en el continente americano disminuyó durante la década de 1970 como consecuencia de la competencia de otros cultivos, comercialmente más rentables como el café, la caña de azúcar y el algodón. Esto favoreció a la India para reestablecerse como primer productor de índigo en el mundo. Sin embargo, esto fue por un tiempo corto,

hasta que en 1890 la producción de índigo sintético desplazó casi en su totalidad al producto natural (Kirk, *et al*, 1962).

1.2.2. Especies vegetales productoras de índigo

El índigo natural puede obtenerse de un amplio rango de plantas de diferentes especies, géneros y familias distribuidas en todo el mundo (Gilbert and Cooke, 2001). Uno de los principales precursores del índigo, el indicán, esta presente en cantidades explotables en muchas familias, entre las que destacan la Acanthaceae, Asclepidaceae, Apocináceae, Fabaceae y Polygonaceae (Marcinek *et al*, 2000). En las áreas tropicales y subtropicales, las especies del género *Indigofera* han prosperado mejor, mientras que en los climas templados la especie más comúnmente usada ha sido *Isatis tinctoria* (pastel). La especie *Polygonum tinctorium* se ha usado también en Japón, China y Rusia para la producción de índigo a gran escala (Gilbert and Cooke, 2001). Otra de las especies con potencial para la producción de índigo es *Baphiocalanthus cussia* cultivada para la producción de colorantes en China, Tailandia y la India (Gamble, 2000; Chanayath *et al*, 2002).

En la Tabla I.1, se muestran las principales especies productoras de índigo. Asimismo, su distribución geográfica se presenta en la Figura I.2 (Cardon et Chatenet, 1990; Mozino, 1994; Ku, 1997; Marcinek, 1999; Bello-Marini, 2005).

También se ha reportado la producción de índigo en menores cantidades en las especies *Calanthe veratrifolia* R. Br, *C. vestita* Rehb, *Epidendron difforme* Jacq., *Bletia sp*, *Phajus indigoferus* Hask y *Phajus grandifolius* de la familia Orquidaceae (Cardon et Chatenet, 1990; Xia and Zenk, 1992).

Tabla 1.1. Especies vegetales productoras de índigo

Espe cie	Familia	Nombres comunes	Carac terísticas
1. <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill 2. <i>Indigofera tinctoria</i> L 3. <i>Indigofera arrecta</i> Hoschst 4. <i>Indigofera argentea</i>	Fabaceae	Añil, jiquilite, nil, nile, planta de índigo	Considerada una de las mejores fuentes de índigo natural. Climas cálido subhúmedo con lluvias en verano.
5. <i>Polygonum tinctorium</i> Ait <i>sinonimia</i> <i>Persicaria tinctoria</i>	Polygonaceae	Índigo, gala	Buenos rendimientos de colorante, menores que los de <i>Indigofera</i> spp. Climas cálidos y húmedos.
6. <i>Isatis tinctoria</i> L 7. <i>Isatis glauca</i> 8. <i>Isatis indigoica</i> 9. <i>Isatis lusitánica</i>	Brassicaceae	Woad, pastel	Clima templado, seco con días soleados
10. <i>Baphicacanthus cusia</i> Kuntze <i>sinonimia</i> <i>Strobilanthes cusia</i> Kuntze	Acantaceae	Chinese woad, rum, asam indigo	Requiere suelos ligeros medios y pesados, alcalinos, básicos o neutros, húmedos.
11. <i>Wrightia tinctoria</i>	Apocynaceae	Dyer's Oleander, Laurier des teintures, Indrajao, Dudhi, Ivory Wood	Colorante azul extraído de las hojas
12. <i>Gynmema tingens</i> <i>sinonimia</i> <i>Bidaria</i> <i>tingens</i> , <i>Asclepios tingens</i>	Asclepidaceae		Fuente de índigo en Indostan

Adaptada de Cardon et Chateret, 1990; Mozino, 1994; Ku, 1997; Marcinek, 1999; Bello-Manini, 2005

Tabla 1. Especies vegetales productoras de índigo (Continuación)

Especie	Familia	Nombres comunes	Características
2. <i>Marsdenia tinctoria</i> R. Brown sinonimia <i>M. globifera</i> Tsiang	Asclepidaceae	Lan Ye Teng, Tarum, Rengat Padi, Alas sanam	Fuente de un colorante semejante al índigo
3. <i>Adenostemma lavinia</i> sinonimia <i>Adenostema viscosum</i> Forst	Asteraceae	Cham-lon-la, tempeldaging	Daun Se usa como planta medicinal en Malasia
4. <i>Eupatorium indigofera</i> Parodi	Compositae		Presencia de colorante azul en las hojas
5. <i>Amorfa</i> spp	Fabacea	Indigobush, indigo, indigobush	false desert Contiene pequeñas cantidades de índigo no suficientes para uso comercial
6. <i>Baptista</i> spp	Fabacea	False indiges	Usada como colorante azul por los "Cherolée", rendimientos comparables a las plantas de <i>Isatis</i>
7. <i>Coronilla scorpioides</i> sinonimia <i>Ornithopus scorpioides</i>	Fabacea	Annual scorpion vetch, yellow crown vetch, alacranera, cantarella	Un colorante semejante al índigo se puede obtener por fermentación de las hojas
8. <i>Crotalaria retusa</i> L	Fabacea		Las hojas contienen indirán
9. <i>Lonchocarpus cyanescens</i> Beth <i>Lonchocarpus laxiflorus</i>	Fabacea	Yoruba indigo Senegal lilac	Todas las partes aéreas de la planta contienen un colorante semejante al índigo. La planta es frecuentemente cultivada en África.

Adaptada de Cardon et Chatenet, 1990; Mozino, 1994; Ku, 1997; Marcinek, 1999; Bello-Maxini, 2005

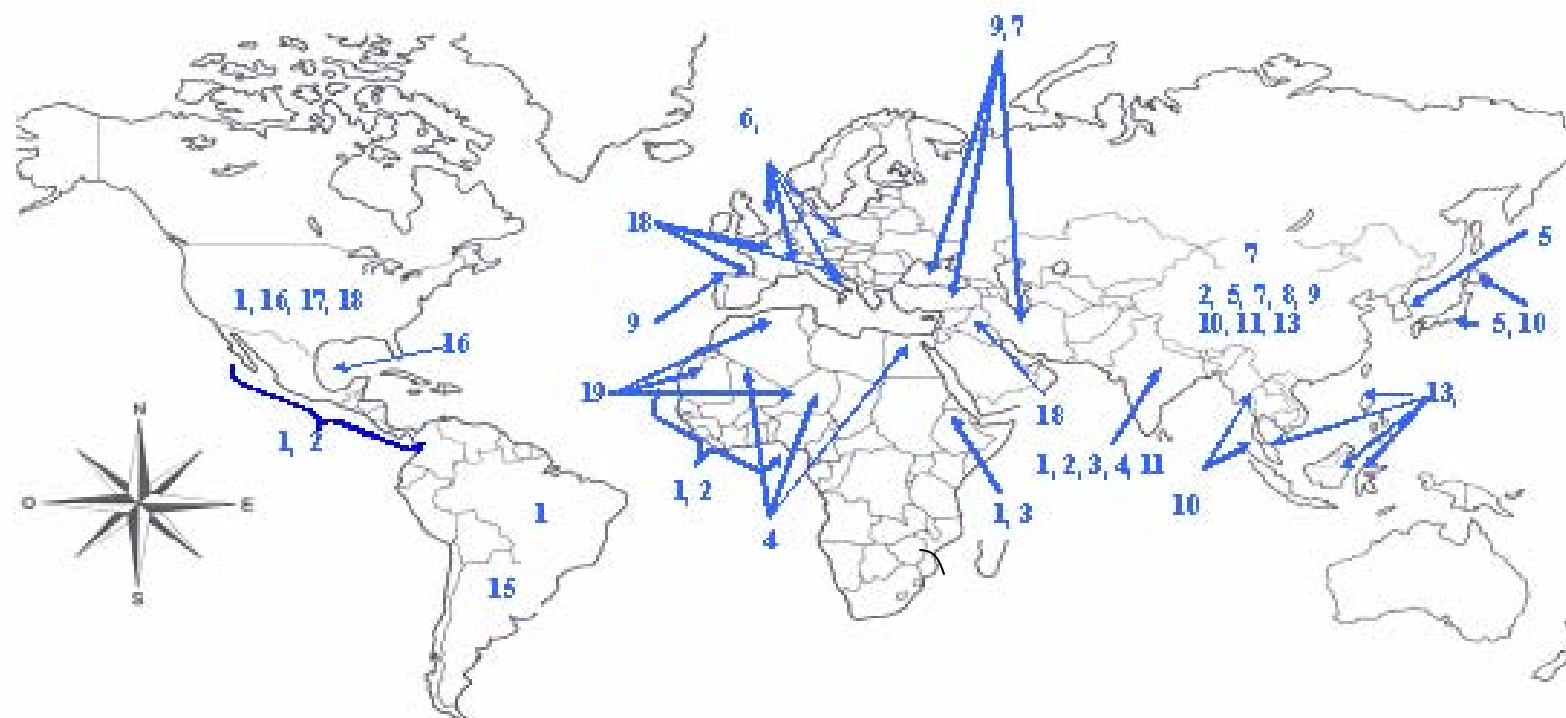


Figura 12. Distribución geográfica de las principales especies productoras de índigo listadas en la Tabla 1 (Adaptada de Cardon et Chatenet, 1990; Moizino, 1994; Ku, 1997; Marcinek, 1999; Bello-Marini, 2005)

I.2.3. La ruta de biosíntesis de índigo en plantas

1.2.3.1. Precursores de la formación de índigo en plantas

El índigo no se encuentra presente en las especies vegetales al momento de hacer la cosecha, en lugar de eso, las plantas de los géneros *Indigofera* (añil) y *Polygonum* acumulan un precursor incoloro soluble en agua llamado indicán (Indoxil β -D-glucósido; Figura I.3), el cual durante el proceso de extracción se hidroliza por acción de una enzima β -glucosidasa liberando por un lado el compuesto glicosídico y por el otro el indoxilo, posteriormente. El indoxilo se dimeriza por oxidación espontánea en presencia de aire para dar origen al compuesto colorido e insoluble en agua llamado índigo (Maier *et al*, 1990, Xia and Zenk, 1992; Stoker *et al*, 1998; Wu *et al*, 1999; Marcinek *et al*, 2000; Minami *et al*, 2000; Angelini *et al*, 2003).

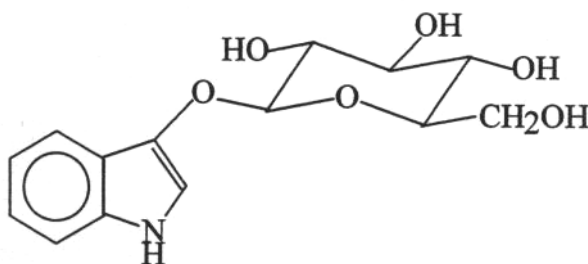


Figura I.3. Estructura química del indicán (Indoxil- β -D-glucósido; Xia and Zenk, 1992)

El papel fisiológico del indicán en las plantas de añil no se conoce con precisión. Se ha sugerido que es un intermediario en la formación de hormonas vegetales o bien que está relacionado con mecanismos de almacenamiento de glucosa (Minami *et al*, 1996). Podría ser también el resultado de mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de herbívoros o insectos de manera similar a lo que ocurre con la acumulación glucósidos cianogénicos en otras plantas. Los glucósidos cianogénicos se almacenan en la vacuola. La ruptura del tejido como consecuencia del impacto mecánico provocado por un herbívoro o un patógeno, pone en contacto el precursor con la β -glucosidasa, separando el azúcar de la unidad de nitrilo, la cual posteriormente se hidroliza a ácido hidrocianico (HCN) y un aldehído. El HCN bloquea la respiración mitocondrial (Wink and Schimer, 2002). Aunque

el indicán es el principal precursor del índigo en plantas del género *Indigofera*, es probable que en las plantas estén presentes más precursores como ocurre con otras especies vegetales.

En la especie *Isatis tinctoria* L. se ha encontrado que existen diferentes compuestos precursores de la formación de índigo. En 1900 Schunk afirmó que el indicán no era el principal precursor de índigo en esta especie. Posteriormente, en ese mismo año, Beijerinck confirmó esta aseveración y designó al compuesto precursor como Isatán (Maier *et al*, 1990). Por su parte, Epstein *et al* (1967) concluyeron que el precursor del índigo en pastel era el indoxil-5-cetogluconato y propusieron el nombre de Isatán B para esta nueva estructura (Figura I.4).

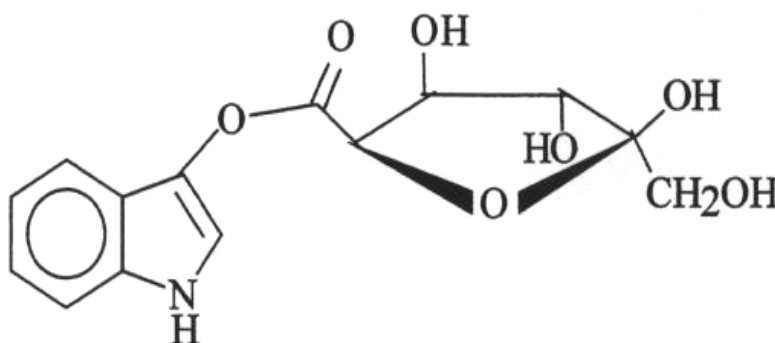


Figura I.4. Estructura química del Isatán B, propuesta por Epstein *et al* (1967)

El isatán B difiere del indicán por la naturaleza del azúcar que está unido al grupo indoxilo y por el tipo de enlace entre ellos. En el primer caso la unión es de naturaleza éster, la cual es muy sensible a la hidrólisis en medio alcalino, en contraste a la unión de tipo éter del indicán, que es mucho más resistente y para romperse requiere la acción de enzimas o la utilización de álcalis fuertes (pH = 13.1) por periodos de tiempo relativamente largos (Kokubun, *et al*, 1998).

Maugard *et al* (2001) reportaron la existencia de un tercer precursor del índigo en las plantas de pastel y llamaron a este compuesto Isatán C. Una investigación reciente, realizada por Oberthür *et al* (2004) con plantas de la especie *Isatis tinctoria* L, mostraron

que existe un patrón complejo de compuestos precursores con altas polaridades, los cuales son muy inestables después de la cosecha. En este mismo trabajo ellos determinan que el principal compuesto precursor del índigo en esta especie no es el Isatán B como se creía hasta ahora, sino otro compuesto al que ellos denominan Isatán A (1H-indol-3-yl 6'-O-(carboxiacetil)-β-D-ribohex-3'-ulopiranosido), y que la estructura del Isatán B corresponde al compuesto 1 H-indol-3-yl β—ribohex-3-ulopiranosido y no al Indoxil-5-cetogluconato (Figura I.5. La principal diferencia entre los dos compuestos descritos por ellos, es que el isatán B tiene unido un átomo de hidrogeno unido al enlace O-C(6') del carbohidrato (Figura I.5 (1)), mientras que el isatán A presenta una unidad carboxiacetil en la misma posición (Figura 1.5 (2)). Por otra parte, mediante estudios de Resonancia Magnético Nuclear (RMN) estos autores determinaron la presencia de los piranósidos (1) y (2) y de sus respectivos hidratos (Figura I.5 (3) y (4)). Este resultado junto con la información de que estos glicósidos están compartimentizados en las vacuolas los llevo a concluir que el isatán B y el isatán A se acumulan en la planta en forma de hidratos.

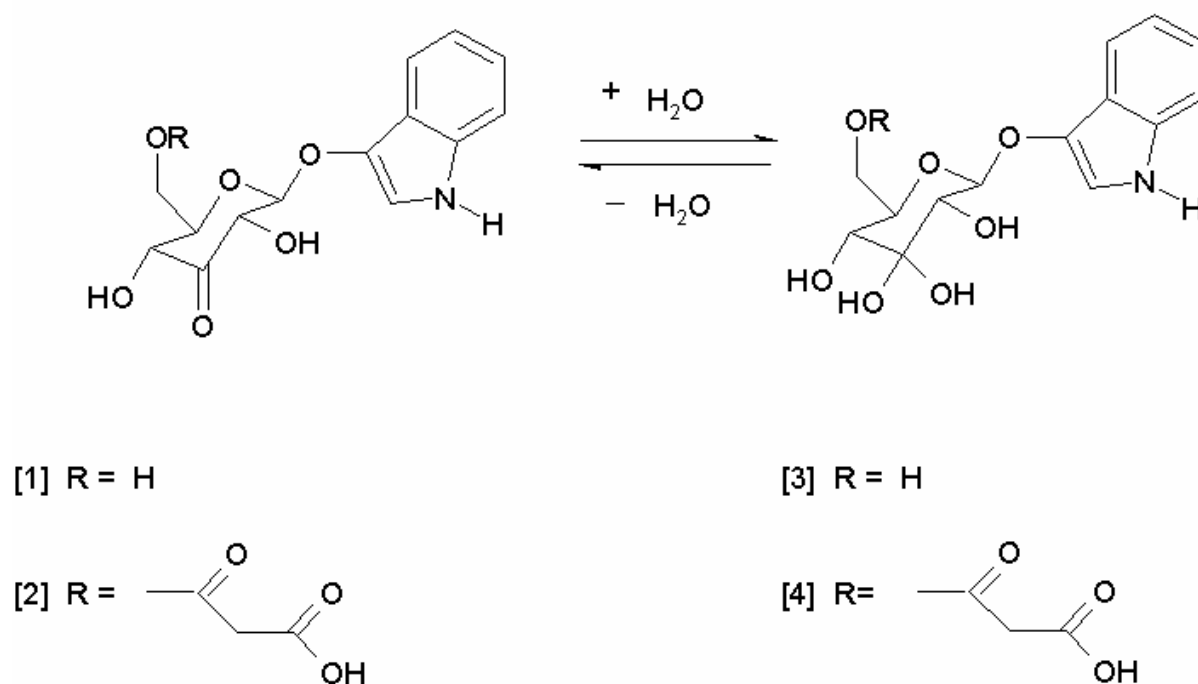


Figura I.5. Estructura química propuesta por Oberthur *et al* (2004) de los principales precursores de la formación de índigo presentes en plantas del género *Isatis*. (1) Isatán B, (2) Isatán A, (3) Forma hidratada del Isatán B, (4) Forma hidratada del Isatán A

Por otra parte, se ha confirmado la presencia de indicán como un precursor menor presente en las plantas del género *Isatis* (Strobel and Gröger, 1989).

1.2.3.2. Hidrólisis y oxidación del indicán

En la Figura I.6 se presenta el mecanismo propuesto, por el cual el indicán se hidroliza liberando D-glucosa e indoxilo, el cual, posteriormente se dimeriza por oxidación en presencia de aire para dar origen al compuesto colorido índigo (Minami *et al*, 1997; 2000; Kokubun *et al*, 1998; Gilbert and Cooke, 2001).

El indoxilo en un medio rico en oxígeno puede oxidarse para formar Isatina (Figura I.6) que al condensarse con el indoxilo, produce indirrubina (Figura I.6). La indirrubina es un isomero del índigo que posee una coloración rojiza. El índigo y la indirrubina le dan al colorante natural su característico tinte violáceo que lo distingue del índigo sintético.

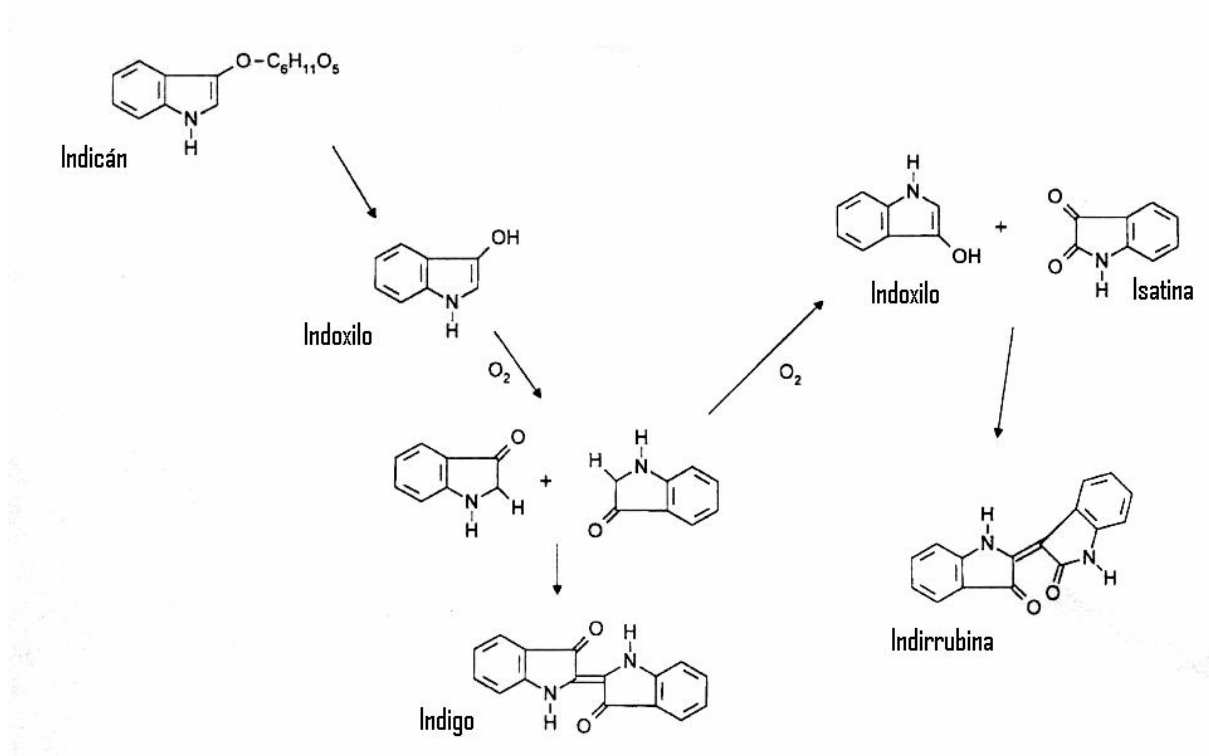


Figura I.6. Mecanismo propuesto para la hidrólisis y oxidación del indicán durante la formación de índigo e indirrubina en plantas (Gilbert and Cooke, 2001)

Se desconocen en detalle las condiciones que favorecen la formación de isatina, índigo e indirrubina pero se cree que un medio reaccional con alta concentración de oxígeno puede conducir a la formación de isatina y a su vez a un aumento en la síntesis de indirrubina.

En las plantas de pastel se ha afirmado que la producción de índigo, isatina e indirrubina depende del precursor, de tal forma que el Isatán B y el indicán son los responsables de la formación de índigo e indirrubina, mientras que el Isatán C forma únicamente indirrubina (Maugard *et al*, 2001).

Aunque los precursores y la enzima están presentes en las células durante la cosecha, debe existir una barrera física o bioquímica que impida que el precursor indicán esté en contacto directo con la enzima β -glucosidasa que cataliza su hidrólisis, debido a que la coexistencia de ambos resultaría en la conversión del indicán a índigo, el cual precipitaría como colorante causando algunos desordenes metabólicos *in vivo*.

Minami *et al* (1997) propusieron las siguientes causas que explicarían el porqué la formación del índigo se presenta hasta el momento en que se realiza la extracción.

- a) Existencia de compartimentización intracelular. La enzima se encuentra en el citosol o en otro organelo tal como el cloroplasto, la mitocondria o el núcleo, mientras que el indicán se encuentra almacenado en la vacuola al igual que ocurre en la mayoría de los metabolitos secundarios.
- b) La enzima se encuentra en el mismo lugar que el precursor, pero el pH del medio no es el adecuado para que la enzima trabaje.
- c) La enzima se encuentra inactiva por la presencia de un inhibidor.

En plantas de *Polygonum* estos mismos autores han encontrado que la enzima β -glucosidasa se localiza en el estroma de los cloroplastos dentro de las células del mesófilo (Minami, *et al*, 1997), mientras que el precursor indicán se almacena en las vacuolas (Minami, *et al*, 2000).

1.2.3.3. Biosíntesis de indicán

Se conoce poco sobre la ruta metabólica de producción del indicán a pesar de que está presente en una amplia variedad de plantas de las familias Asclepiadácea, Apocinácea, Fabacea y Polygonacea (Marcinek *et al*, 2000). Existen diferentes teorías sobre la formación de este compuesto, algunas de ellas contradictorias. Maier *et al* (1990) reportaron que la administración de L-(5-³H)Tryptofano a cultivos *in vivo* e *in vitro* de las especies *Isatis tinctoria* y *Polygonum tinctorium* derivaba en la formación de compuestos indoxílicos marcados por lo que concluyeron que triptofano era el compuesto precursor en

la síntesis de indicán e isatán B. Sin embargo, Xia and Zenk (1992), demostraron por ^{13}C NMR y espectroscopia de masas que el indol es el precursor de los derivados indoxílicos en diferentes especies vegetales es el indol y no el L-triptofano, como se había afirmado con anterioridad.

La enzima que cataliza la transferencia de glucosa de uridin difosfato glucosa a indoxilo para dar origen al indicán se ha aislado y purificado en *Baphicacanthus cusia* (Marcinek *et al*, 2000) y *Polygonum tinctorium* (Figura I.7, Minami *et al*, 2000). En el primer caso, la enzima indican sintasa mostró un pH optimo de 8.5 con un punto isoelectrico de 6.5 y una temperatura optima de 30°C, a diferencia de ésta, la enzima de *Polygonum* mostró un pH optimo cercano a 10.

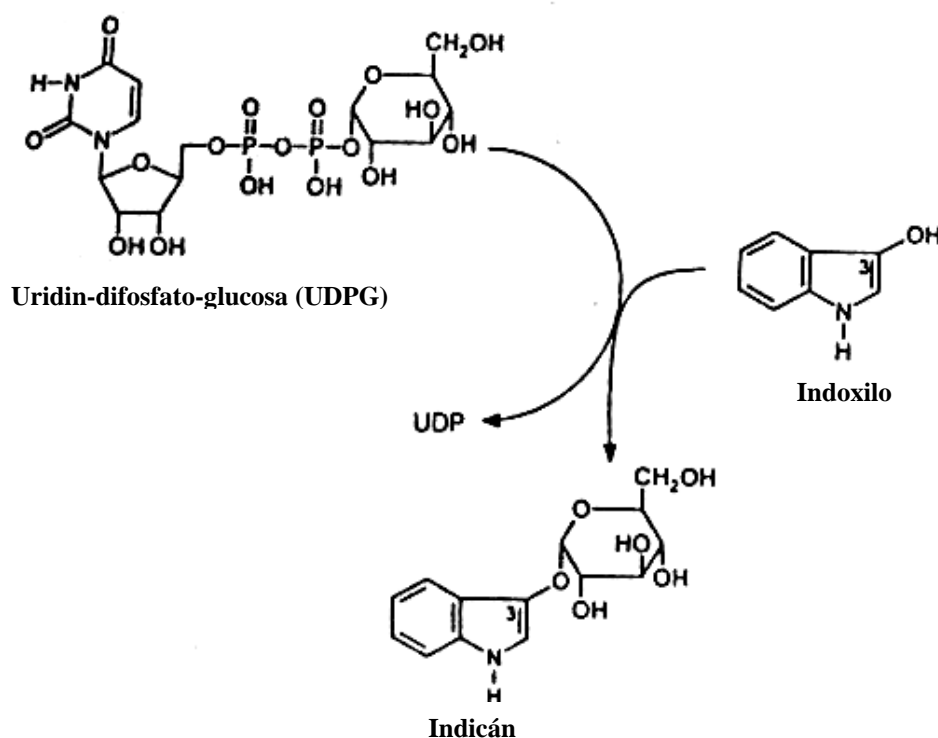


Figura I.7. Biosíntesis de indicán en plantas (Minami *et al*, 2000)

1.2.4. Composición del índigo

El índigo químicamente puro recibe el nombre de índigo o indigotina. Su fórmula química es 2-(1,3-dihidro-3-oxo-2H-indol-2-ilideno)-1,2-dihidro-3H-indolo-3-ona; ($\Delta^{2,2'}$ – biindolina)-3,3'-diona y su fórmula condensada es $C_{16}H_{10}N_2O_2$ (Index Merck, 1953). La estructura química del índigo se presenta en la Figura I.8.

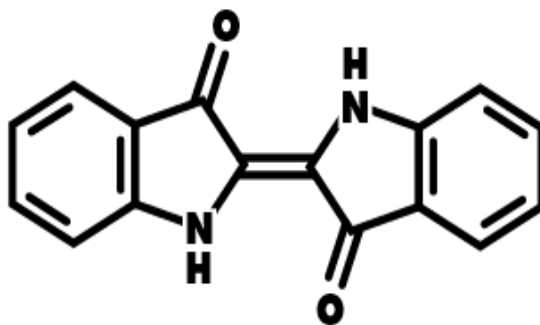


Figura I.8. Estructura química del índigo

En estado sólido es un polvo cristalino, de color azul oscuro, brillo bronceado, soluble en anilina, nitrobencono, ácido acético glacial y ácido sulfúrico concentrado (Frías, 2001).

El índigo es prácticamente insoluble en agua, en soluciones ácidas o básicas y en la mayoría de los solventes orgánicos, pero especialmente en los solventes polares. En los solventes polares posee una solubilidad parcial, como por ejemplo en anilina, nitrobencono, fenol y dimetilsulfoxido. En cloroformo, acetona, acetato de etilo y dimetilformamida se disuelve de manera diferencial (Matadamas-Ortiz, 2002).

El sistema cromóforo del índigo consiste de una doble ligadura $C=C$, de dos grupos de sustitución donadores X y de dos grupos de sustitución aceptores $C=Y$ (Figura I.9). Este sistema cromóforo es denominado conjugado cruzado o en forma de H (Matadamas-Ortiz, 2002).

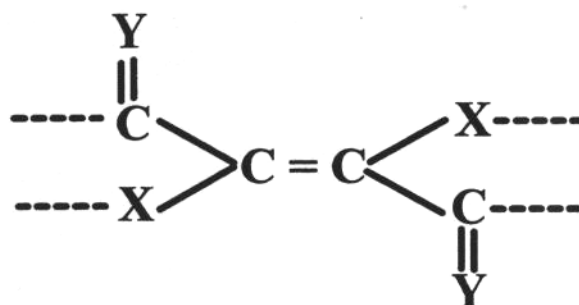


Figura I.9. Grupo cromóforo presente en índigo

El índigo presenta isomerismo *cis-trans* respecto a la unión central C=C de manera espontánea, pero en estado sólido solo se detecta la forma *trans* debido a la estabilidad conferida por sus puentes de hidrógeno intra e intermoleculares, se sublima cerca de los 300°C y se descompone a 390°C (Figura I.10; Itoh *et al*, 1989; Frías, 2001; Matadamas-Ortiz, 2002).

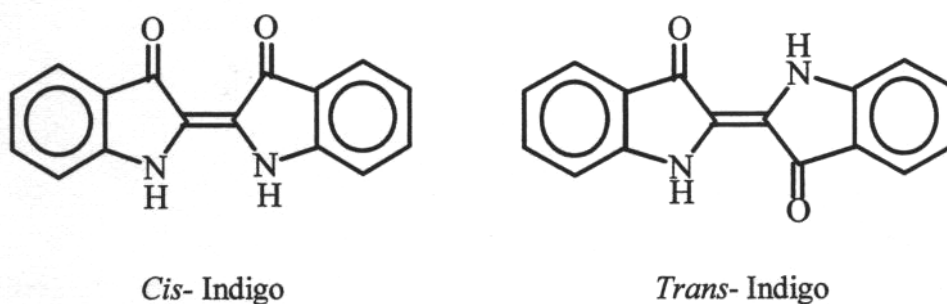


Figura I.10. Formas isómeras del índigo

El índigo también presenta isomerismo estructural y el isómero de este tipo más conocido es la indirrubina (Figura I.11) la cual tiene una coloración roja, diferente grado de solubilidad y un espectro de absorción distinto al del índigo.

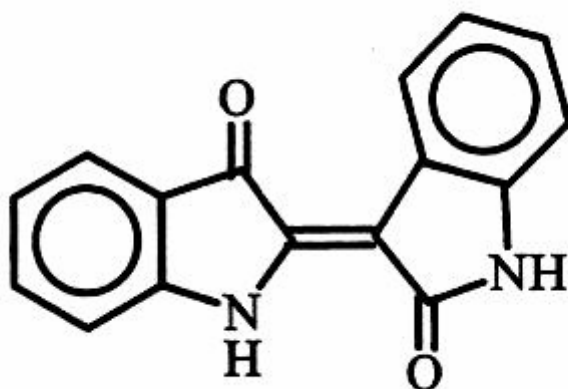


Figura I.11. Estructura química de la indirrubina

En la industria textil el índigo se considera como un colorante a la tina. Los colorantes a la tina son completamente insolubles en agua y no pueden usarse para el teñido sin modificación química. Cuando estos compuestos se tratan con un agente reductor se convierten a su forma leuco, la cual es incolora y soluble en agua en presencia de álcalis (Figura I.12).

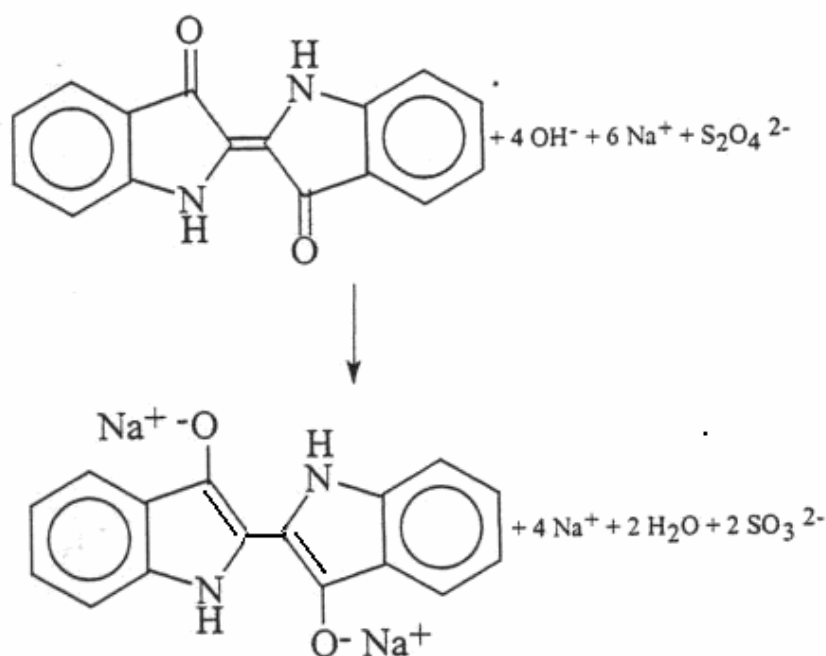


Figura I.12. Formación del compuesto “leuco” durante la reducción del índigo

Los compuestos leuco son altamente afines a la celulosa y se reoxidan formando nuevamente el compuesto coloreado, cuando la fibra se expone al aire (Figura I.13).

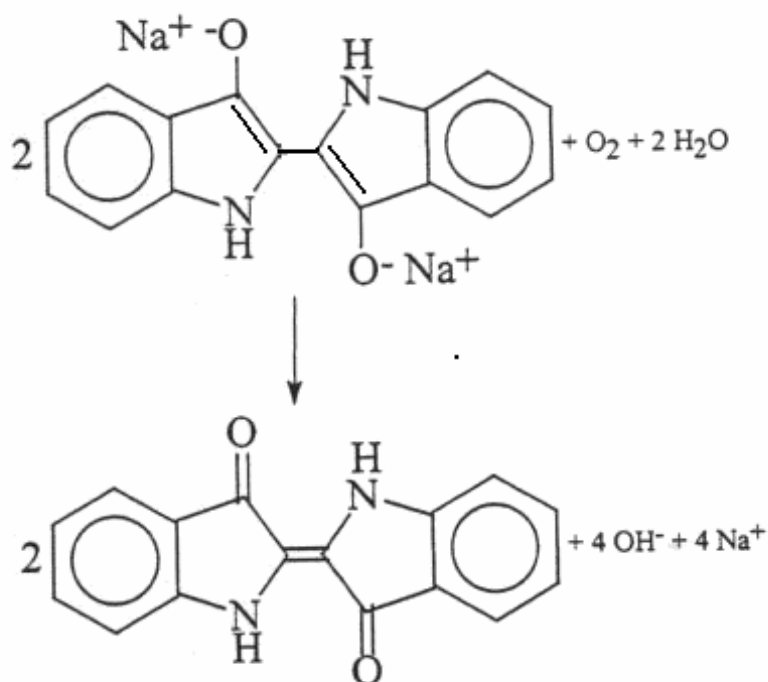


Figura I.13. Reoxidación del leucoíndigo por exposición al aire durante el teñido

Antes de la aparición de los agentes reductores comerciales, los colorantes a la tina se reducían por fermentación de materia orgánica en recipientes llamados “tinan”, de ahí deriva su nombre (Trotman, 1990, Pérez, 2001). Como agentes reductores pueden usarse la ditionita de sodio (hidrosulfito de sodio), la hidroxiacetona, y los iones de zinc o de hidrogeno (Reyes-Salas, 2004).

Los colorantes a la tina constituyen el grupo más importante de los que se utilizan para teñir algodón, porque proporcionan los medios para obtener las mejores solidesces a la luz y al lavado, ya sea en material como borra, hilo, tejidos de punto o tejidos planos. Debido a esto los colorantes a la tina encuentran amplia aplicación para tapicería, material para vestidos, camisas, toallas, sábanas, pañuelos, hilos para bordar y coser y en general para todos los artículos que requieren solidez a la luz y al lavado (Pardo, 1983).

La acción de los agentes oxidantes da origen al dehidroíndigo (teñido) o puede romper la molécula en la doble ligadura y formar la isatina (Figura I.14). La isatina se puede producir con ayuda del ácido nítrico o por medio del permanganato o cromato (Venkataraman, 1952; Reyes-Salas *et al*, 2004).

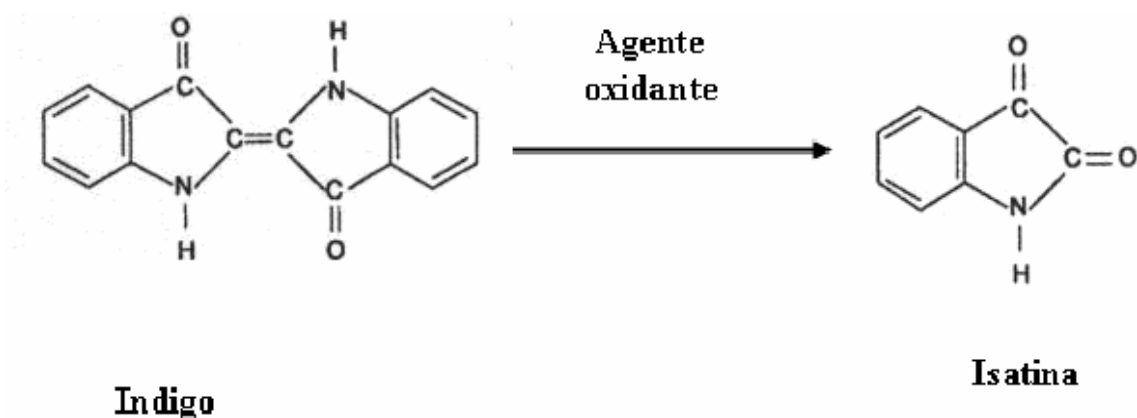


Figura I.14. Oxidación del índigo para formar isatina

Los ácidos minerales fuertes descomponen al índigo formando sales en solución acuosa. El ácido sulfúrico concentrado transforma al índigo en un colorante hidrosoluble, el carmín de indigotina N (ácido disulfónico 5,5'), el cual fue ampliamente utilizado en alguna época para teñir lana.

La formación de halógenos (di, tri y tetrahalógenos) de índigo da como resultado compuestos que poseen una mayor resistencia a la acción del cloro y brindan una amplia gama de tintes. Aunque los halógenos de índigo normalmente son azules, cuando la sustitución se lleva a cabo en los carbonos 6'6 de los anillos bencénicos el color puede variar (Matadamas- Ortiz 2002).

El derivado dibromo-6'6 es de color rojo violáceo, este colorante conocido como “Púrpura tyrian” se extrae en forma natural de algunas especies de moluscos como el *Murex trunculus* y *Murex brandaris* (Michel, *et al*, 1992). Por fotooxidación del leucoderivado es posible revertir la halogenación del 6,6-dibromoíndigo obteniendo una gamma de colores que van desde del púrpura hasta el azul (Figura I.15, Mc Govern *et al*, 1990; Wouters and Verhecken, 1991).

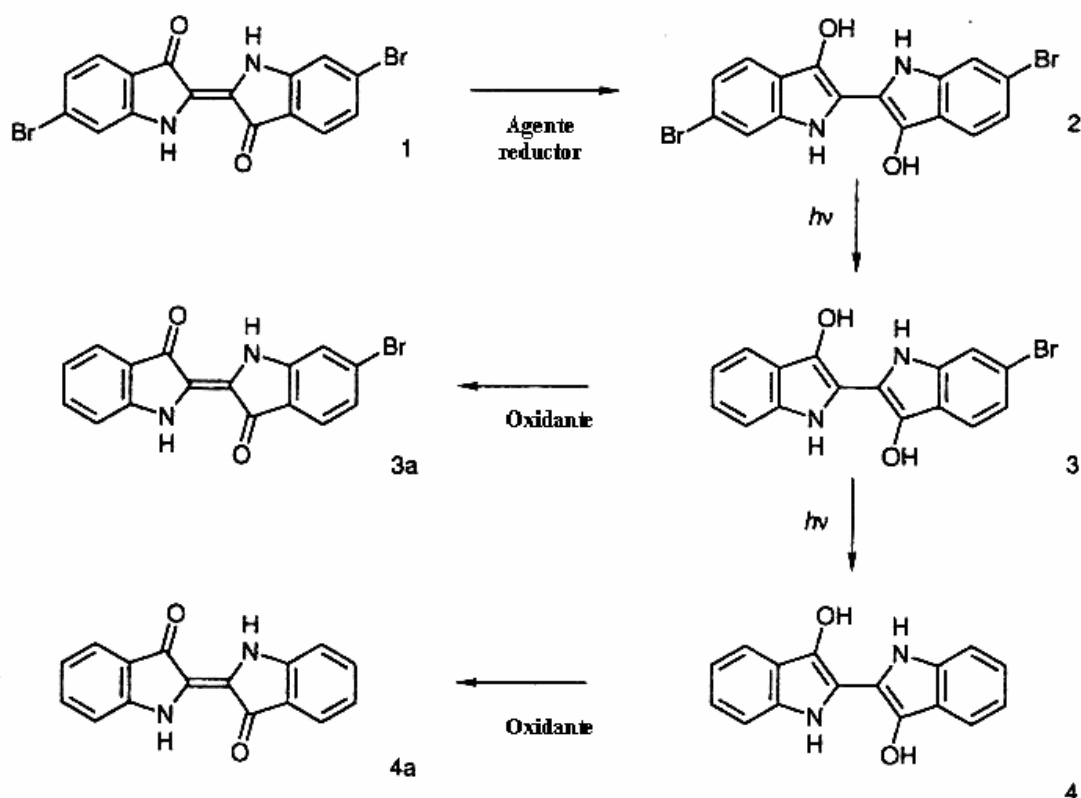


Figura I.15. Fotooxidación del dibromoíndigo. (1) 6,6'-dibromoíndigo, (2) forma leuco del 6,6' dibromoíndigo, (3) forma leuco del 6-monobromoíndigo, (3a) 6-monobromoíndigo, (4) leuco índigo, (4a) índigo (Mc Govern *et al*, 1990)

Los extractos obtenidos de las indigoferas o del pastel contiene además del índigo otras moléculas colorantes como la indirrubina de color rojo, la indirectina o índigo café y sustancias de color amarillo, algunos flavonoides como el kaemferol, la quercitina, la luteolina o la apigenina (Thomas, 1998).

De la composición del añil comercial se menciona que hay índigo, indirrubina o rojo índigo, indihumina o pardo de índigo, sustancia gelatinosa, materiales nitrógenados y sales minerales, como arena, silicato, calcio, potasio, manganeso y hierro. Se considera también que el de buena calidad no debe producir más del 70% de ceniza ligera, debe flotar sobre el agua y ser de color azul oscuro con reflejos cobrizos metálicos, adherente a los labios (Pérez, 2001). Un buen índigo de Bengala contiene 60% del pigmento índigo, 20 % de

materia mineral, aprox. 7% de otros pigmentos entre ellos indirrubina y el resto de materia orgánica (Clark *et al*, 1993).

En la antigüedad el índigo frecuentemente se adulteraba con excremento de paloma o con tiza coloreada. Como prueba de autenticidad, entre los romanos se recomendaba quemar el índigo y si se obtenía una flama púrpura entonces el índigo era auténtico, aunque esta afirmación no es del todo precisa ya que es un compuesto orgánico inusualmente estable (Clark *et al*, 1993).

I.2.5. Procesos de extracción de índigo a partir de plantas

1.2.5.1. Extracción de plantas de añil

Según Marzocca para la industrialización, la cosecha de las hojas o las plantas de añil se debe hacer cuando las flores comienzan a abrirse o un poco antes de la floración que es el momento en el que poseen más indicán (Mederos, 2001).

La extracción en forma tradicional del índigo en los obrajes consiste en pasajes sucesivos de las hojas o trozos de las plantas por tanques o depósitos de mampostería o de madera en los que después de la adición de agua sufren un proceso de fermentación (Figura I.16). El proceso consiste de las siguientes etapas (Mederos, 2001, Barrera y Ramírez, 2003).

- a) Maceración en un tanque “templador” o “mojador”. Las plantas se colocan en forma cruzada, cubriendolas con una capa de 30 cm de agua sobre el bastidor que mantenga en el fondo la materia vegetal, esta operación dura de 30 horas hasta dos días. Aquí se lleva a cabo el proceso de lixiviación en el que se disuelve el indicán, el agua burbujea y se produce una espuma violeta con reflejos cobrizos debido a que se produce el desdoblamiento del glucósido, posiblemente gracias a la acción de una enzima contenida en las hojas, el tiempo de maceración puede reducirse a 10 horas empleando agua caliente. El tiempo de extracción es importante ya que si es muy corto, queda indicán sin disolver y si es muy largo, se corre el riesgo de descomposición de la materia prima, perjudicando la calidad del producto final. El pilero reconoce cuando la fermentación ha terminado por el olor, el color del líquido y en algunos casos por el sabor.



Figura I.16. Tanques utilizados en la extracción de añil orgánico en la finca “Los nacimientos”, San Salvador, El Salvador CA

- b) La aireación o batido se realiza en un tanque batidor situado a nivel más bajo que el anterior al que pasa el líquido de color verdoso amarillento del primer tanque; aquí se remueve sin cesar con la ayuda de remos o palos de madera para provocar la oxidación del precursor a índigo, tomando el líquido un aspecto turbio y un color azul intenso, y comenzando a depositarse en el fondo el índigo (Figura I.17). Esta operación dura unas 12 – 24 hrs.



Figura I.17. Aireación manual del extracto de añil en la finca “Los nacimientos”, San Salvador, El Salvador CA

Los batidores determinan el momento en que el batido debe terminar por los cambios de apariencia del líquido que pasa de verdosos a tornasol y finalmente a azul. En algunos lugares de México se adiciona queso seco masticado para disminuir la espuma durante la aereación o frutos molidos de “gulabere”, que es el fruto de un árbol de tierra caliente que crece en los mismos climas que el añil, para favorecer la precipitación del colorante. Otro de los coagulantes utilizados es la cal en proporciones de cinco kilos por cada 10 kilos de añil.

- c) Reposado, en un tanque “reposador” o “recibidor”, que normalmente es de menor tamaño y debe hallarse a la sombra, el líquido con colorante en suspensión se decanta en esta área; esta tarea dura unas 10 horas pero puede acelerarse agregando lechada de cal y un poco de alumbre. El colorante que se va depositando en el fondo se recoge y se pone en bolsitas de lienzo o de cáñamo, que se cuelgan a la sombra para escurrir más agua (Figura I.18).



Figura I.18. Tina de reposo de añil. Se observa el vaciado de la pasta en forma manual en la finca “Los nacimientos”, San Salvador, El Salvador CA

- d) Finalmente el colorante se prensa en moldes, que se secan al sol y luego a la sombra, se envasa y se entrega al comercio. Otras veces el colorante de la tina de reposo se calienta y se filtra en filtros prensa y se corta el producto en panes que se desecan en desecadores especiales. Esto tiene como objeto evitar la putrefacción

del producto, disolver las materias extractivas pardas que lleva adheridas y hacer más vivo su color (Figura I.19)



Figura I.19. Procedimiento utilizado en algunas regiones productoras de añil para el calentamiento de la pasta en la finca “Los nacimientos”, San Salvador, El Salvador CA

La siguiente descripción es representativa de la forma en que se realizaba la extracción en la India durante el siglo XIX (Clark et al, 1993).

“Las plantas cortadas se atan en manojos los cuales se depositan en tanques y se cubren con agua fría limpia. Los tanques los cuales normalmente están contruidos de ladrillos y cemento tienen un área de aproximadamente 400 pies cuadrados de superficie y 3 pies de profundidad y están arreglados en dos hileras, una hilera de tanques de fermentación y otra de tanques batidores. La plantas se dejan en fermentación en los tanques durante aproximadamente 10-15 horas, el licor obtenido de color amarillo pálido se pasa a los tanques batidores y se agita en forma manual o mecánica. El color del licor cambia de amarillo a verde y finalmente se torna de color azul y se precipita en el fondo de los tanques. El líquido sobrenadante se desecha y el resto del material se calienta con agua durante algunas horas para remover las impurezas, posteriormente se filtra en sacos de tela y se presiona para remover la humedad, finalmente se corta en cubos y se seca al medio ambiente”.

1.2.5.2. La extracción del colorante en plantas de pastel

El método tradicional utilizado para la elaboración de las cocañas se presenta en la Figura I.20. Consiste en la fabricación de “bolas” de material vegetal sometidas a procesos alternos de fermentación y secado, que finalmente daban como resultado unas esferas de material vegetal deshidratado (cocañas) con las materias colorantes indigoides contenidas en éstas. Después de un proceso de molido se obtenía el “agranat”. El agranat era el producto que era comercializado y que podía utilizarse sin transformación alguna en las cubas de los teñidores (Hurry, 1930; Matadamas-Ortiz, 2002).

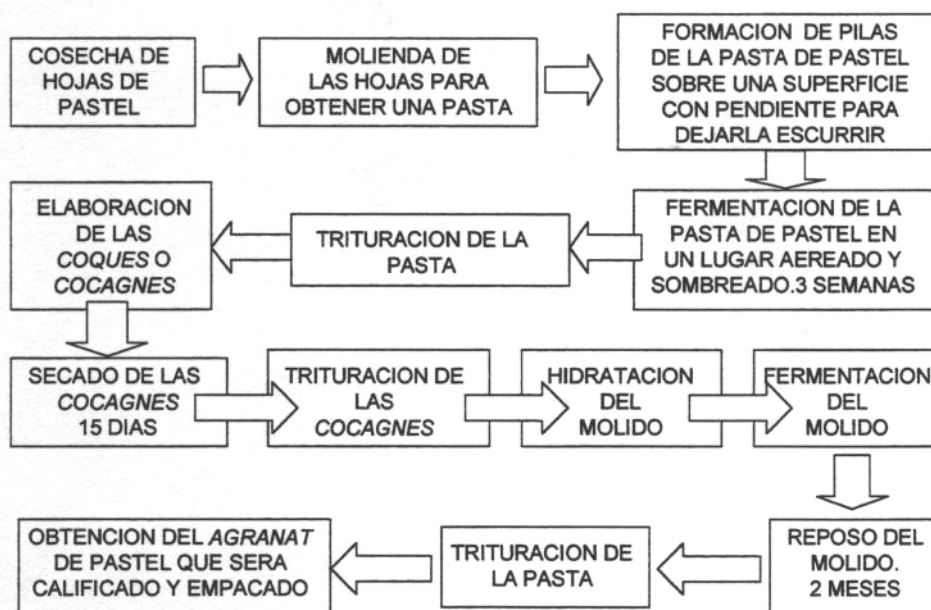


Figura I.20. Diagrama de procesamiento tradicional de hojas de pastel para obtener el colorante

Existen otros métodos usados para la extracción de índigo a partir de hojas de pastel, entre los que se encuentran la maceración en agua a temperatura ambiente, la cual se realizaba en cubas construidas de ladrillos o de madera con una capacidad de 150 a 200 kg de hojas (De Puymaurin, 1813), la infusión con agua a ebullición y adición de cal, ácido sulfúrico, hidróxido de amonio y/o carbonato de sodio durante la etapa de precipitación (Giobert, 1813, Matadamas-Ortiz, 2002).

Recientemente se han desarrollado métodos para la extracción del índigo presente en las hojas de pastel a escalas que van de los 50 a los 300 Kg (Stoker et al, 1998; Matadamas-Ortiz, 2002, Bechtold *et al*, 2002).

1.2.6. Usos del índigo y la indirubina

En la actualidad el principal mercado para el índigo es el teñido de las fibras de algodón que se utilizan en la elaboración de la mezclilla (Mark and Ho, 1995; Bechtold *et al*, 2002). El índigo también se utiliza para el teñido de otras fibras naturales como la seda, la lana y el lino (Miller, 1999).

Además de las aplicaciones textiles el índigo se utiliza para la preparación de numerosas sustancias conocidas en el comercio, en las artes y sobre todo en farmacia, tales como: la resina copal, la goma kino, la goma guta, los inciensos y los barnices (Mederos, 2001).

En aplicaciones medicinales el índigo natural se ha usado en la medicina china tradicional como hemostático, antipirético, anti-inflamatorio, sedante, antibacteriano y antiviral (Eisenbrand *et al*, 2004). También se ha reportado su posible uso en procesos de captación de energía solar (Ensley and Burt, 1985).

Debido a su poca estabilidad durante el proceso del teñido, la indirubina se había considerado hasta ahora como una desviación de la producción de índigo. Sin embargo, diferentes estudios han mostrado las propiedades y posibles aplicaciones medicinales de este componente en el tratamiento del cáncer, particularmente la leucemia (Gan *et al*, 1985; Eisenbrand *et al*, 2004), y como anti-inflamatorio (Kunikata *et al*, 2000), lo que hace atractiva su producción comercial.

1.4. Alternativas de producción de índigo natural

1.4.1. Cultivo *in vitro* de plantas

El uso del cultivo de células, tejidos y órganos vegetales representa una opción biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios, entre ellos los colorantes naturales, debido a que es posible controlar y manipular las condiciones de cultivo que favorezcan la producción del compuesto de interés y escalar los procesos de producción a nivel industrial (Schlatmann *et al*, 1996).

Se sabe que una célula vegetal cuenta con la misma información genética que la planta completa, lo que hace pensar que es posible obtener los mismos compuestos cuando se utilizan cultivos en campo y cultivos celulares bajo condiciones controladas. Las principales especies vegetales productoras de índigo se han utilizado con estos fines.

Shin and Lee (1993) establecieron cultivos *in vitro* en un biorreactor air-lift de la especie *Polygonum tinctorium*. Estos cultivos produjeron indirubina, el pigmento rojo similar en estructura al índigo. Posteriormente Kim *et al* (1997) incrementaron la producción en 72% al aplicar elicitación con quitosán.

Los “elicitores” fúngicos se utilizan ampliamente para incrementar el rendimiento de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos vegetales. Marero *et al* (1997) evaluaron el efecto seis elicitores fúngicos sobre la producción de indirrubina en cultivos de *Polygonum tinctorium*, logrando incrementos en la producción de hasta 168% cuando se usaron elicitores provenientes de la pared celular de *Rhizotocnia solani*.

Respecto a la producción de índigo, Mederos (2001) estableció cultivos de tejidos de añil (*Indigofera suffruticosa*) en los que se detectó por cromatografía en capa fina la presencia del precursor indicán.

Aunque hasta el momento no se ha reportado el uso de cultivos *in vitro* del género *Isatis* para la producción de colorantes, la factibilidad de utilizar los cultivos de órganos de estas plantas para la producción de metabolitos secundarios se demostró recientemente por Tiefeng *et al* (2004). En su trabajo ellos encontraron que los cultivos de raíces transformadas de la especie *Isatis indigoica* Fort producen ácidos orgánicos de interés comercial.

1.4.2. Producción microbiana

Diferentes cepas de microorganismos se han utilizado y en algunos casos se han modificado genéticamente para inducir en ellas la producción de índigo o de alguno de los precursores de este compuesto.

En 1928 Gray describió un proceso para preparar índigo a partir de indol usando microorganismos del género *Pseudomonas*. Posteriormente, en 1962 se propuso el empleo de cepas de *Mycobacterium* y *Micrococcus* (Goto *et al*, 1996).

Aprovechando la capacidad de algunas cepas bacterianas de acumular indol (ya sea en forma endógena o inducida), Ensley *et al* (1983) y Ensley and Burt (1985), propusieron incorporar por modificación genética de estos microorganismos la capacidad de producir una enzima dioxigenasa aromática (Naftalen dioxigenasa: NDO), que cataliza la transformación oxidativa del indol celular para dar como producto final indoxilo, el cual por un proceso de oxidación forma índigo (Figura I.21).

Bajo condiciones normales la NDO presenta una baja actividad enzimática. La adición de hierro al medio de cultivo de fermentación mejora las propiedades de esta enzima debido a que este elemento forma parte de su grupo prostético (Matadamas-Ortiz, 2002).

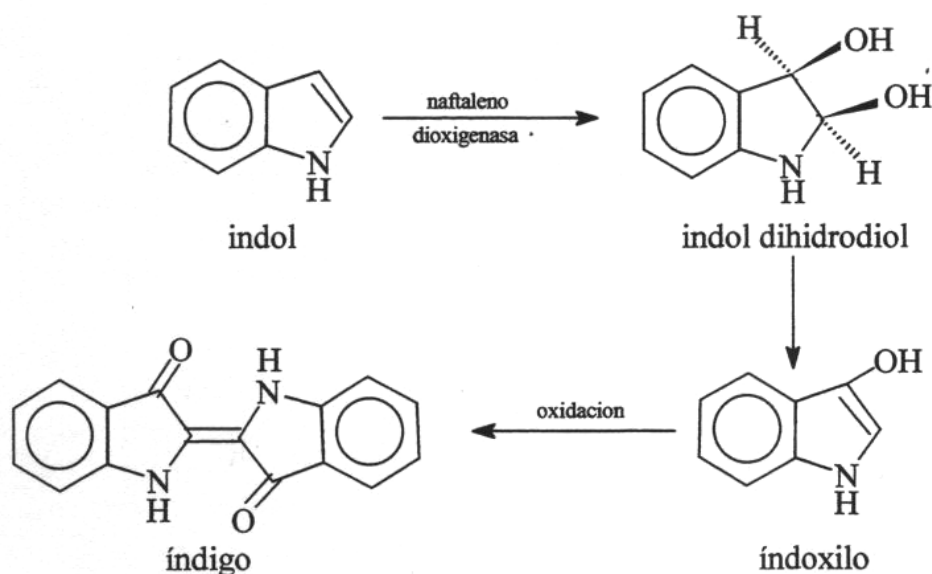


Figura I.21. Biosíntesis de índigo en microorganismos a partir del indol (Ensley *et al*, 1988)

Se conoce bien que los microorganismos contienen rutas biosintéticas para la producción de los 20 aminoácidos esenciales incluyendo el L-triptofano. La síntesis “de novo” de aminoácidos aromáticos sigue una ruta común vía corismato. Después de la síntesis de este compuesto, se forma indol-3-glicerol fosfato (InGP), el cual en conjunción con L-serina es transformado a triptofano, en una reacción catalizada por la enzima Triptofano sintasa. El indol se produce como intermediario metabólico, pero se conjuga de forma espontánea con la L-serina. De tal manera, que normalmente los microorganismos no producen indol libre (Murdock, 1994).

Mediante la utilización de un operón exógeno modificado que promueve la producción de indol en lugar de triptofano, Murdock (1994) mostró la posibilidad de producir intracelularmente este compuesto a altos niveles de glucosa. El indol producido de esta manera puede ser convertido a índigo a través de la acción de otro sistema enzimático, seguido por la exposición al aire.

Oriel and Kim (1998) desarrollaron un método para la producción microbiana de índigo a partir de indol en cultivos de *Escherichia coli* modificados genéticamente. En estos cultivos se insertó con ayuda de un plásmido, el gen proveniente de una cepa bacteriana de *Bacillus stearothermophilus* que codifica para la producción de la enzima fenolhidroxilasa, la cual cataliza la conversión de indol a indoxilo. De acuerdo con este trabajo, el triptofano

es convertido a indol por una triptofanasa presente en *E. coli*, por un mecanismo de oxidación.

El principal problema cuando se utiliza indol exógeno como precursor de la formación de índigo en cultivos microbianos es su toxicidad a altos niveles, lo que impide incrementar los rendimientos. Doukyu *et al* (1998; 2002) propusieron como solución la adición de solventes orgánicos al medio de cultivo, los cuales funcionan como reservorios del sustrato toxico indol y reducen su concentración en el medio. Usando este sistema con una cepa recombinante de *E. coli*, la cual contenía el gen que codifica para la enzima fenol hidroxilasa de *Acinetobacter sp* ST-550, ellos consiguieron obtener rendimientos cuatro veces más altos que los reportados anteriormente (52 μg de índigo mL^{-1}).

En la producción de índigo también se han utilizado algunas cepas de hongos. La presencia de un pigmento azul insoluble en agua en cultivos de hongos fue reportada por primera vez en 1950 por Papazian en una línea mutante de *Schizophyllum commune*. Este pigmento fue identificado posteriormente como índigo por Miles *et al* en 1956 (Matadamas-Ortiz, 2002). Posteriormente Falange y Bobbio (1962) aislaron una línea mutante de *Agaricus campestris* Fr., la cual producía dos pigmentos: el primero de color azul y el segundo de color rojo, presumiblemente se trataba de índigo e indirrubina.

Por su parte Eyal *et al* (1991) propusieron el uso de una cepa de *Morchela rotunda* en cultivo sumergido para la producción de índigo natural. El proceso contempla la producción y la extracción con solventes del colorante natural.

1.5. El índigo sintético

1.5.1. Antecedentes históricos

Tres químicos desempeñaron un papel clave en el descubrimiento del índigo, dos universitarios, Baeyer y Carl Herman (1850-1893) y el químico industrial Caro, que colaboró con Baeyer a partir de 1876. El problema no era nada sencillo Baeyer había iniciado sus trabajos en 1865 y pese a su excepcional talento no consiguió identificar la estructura del índigo hasta 1883. Sin embargo en 1868 ya contaba con información acerca de la estructura parcial. Baeyer realizó en 1878, y después en 1882, la síntesis de índigo por dos vías diferentes (Clark *et al*, 1993). La primera de ellas, a partir del ácido cinámico y la otra a partir de o-nitrotolueno (Matadamas-Ortiz, 2002). Sin embargo, estos procesos de síntesis eran muy engorrosos para ser llevados a escala industrial.

En 1890 Heuman desarrolló otro proceso. En este procedimiento se utilizaba fenilglicina obtenida a partir del benceno (Murdock, 1994).

Debido a que los rendimientos obtenidos todavía no eran lo suficientemente altos, ese mismo año Heuman publicó una modificación del procedimiento utilizando ácido antranílico derivado del naftaleno, un compuesto que podía obtenerse en grandes cantidades. Usando este proceso BASF (Badische Anilin- und Soda-Fabrik) inicio la producción industrial de este compuesto en Ludwighafen en 1897 (Trotman, 1990).

Para el año 1900 la cantidad de índigo producida era equivalente a la obtenida en un millón de acres en la India y las 19000 toneladas que se exportaban de este país en 1897 disminuyeron a 8000 en 1901 hasta llegar a 1000 en 1914. Adolf von Baeyer fue galardonado con el premio Nobel en 1905 por sus investigaciones sobre colorantes orgánicos y compuestos hidroaromáticos. BASF fue la primera empresa productora de índigo sintético. Durante las investigaciones invirtió alrededor de 900,000 libras y se generaron 152 patentes alemanas, posteriormente otras empresas como CIBA (Chemische Industrie zu Basel) y Farbwerke Hoechst y muchas otras empezaron a producirlo generando grandes incentivos para la investigación y la innovación en el proceso industrial (Clark *et al*, 1993).

I.5.1. Procesos de síntesis

El proceso de síntesis de índigo desarrollado por Heuman consiste en una serie de reacciones químicas (Trotman, 1990), en las que el primer paso es la oxidación del naftaleno a ácido ftálico (Figura I.22).

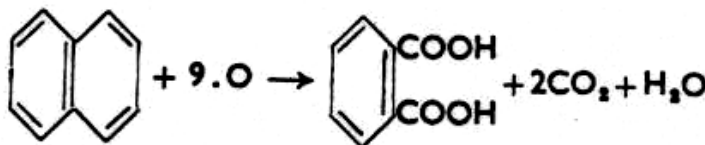


Figura I.22. Primera etapa en la síntesis química de índigo. Oxidación del naftaleno (Trotman, 1990)

Cuando el ácido ftálico se destila se convierte en ftálico anhídrido y por calentamiento con amonio bajo presión se convierte a ftalimida (Figura I.23).

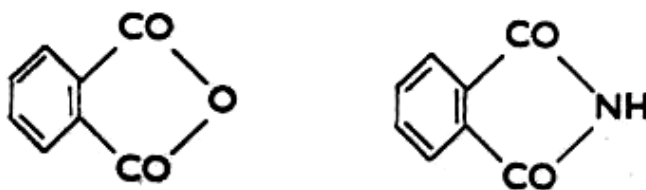


Figura I.23. Formación de ftalimida (Trotman, 1990)

La oxidación con hipoclorito de sodio convierte la ftalimida en ácido antranílico (Figura I.24).

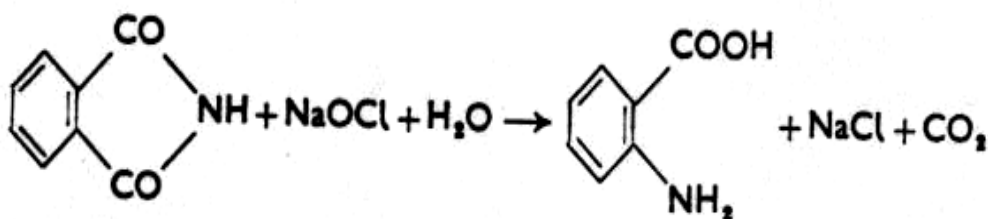


Figura I.24. Oxidación de la ftalimida (Trotman, 1990)

Posteriormente, con una serie de reacciones con ácido cloroacético se obtiene la fenilglicina-o-ácido carboxílico, la cual es convertida a indoxilo por fusión con hidróxido de sodio. La oxidación final se lleva a cabo haciendo pasar aire a través de la solución del derivado sódico del indoxilo dando como producto final el índigo (Figura I.25).

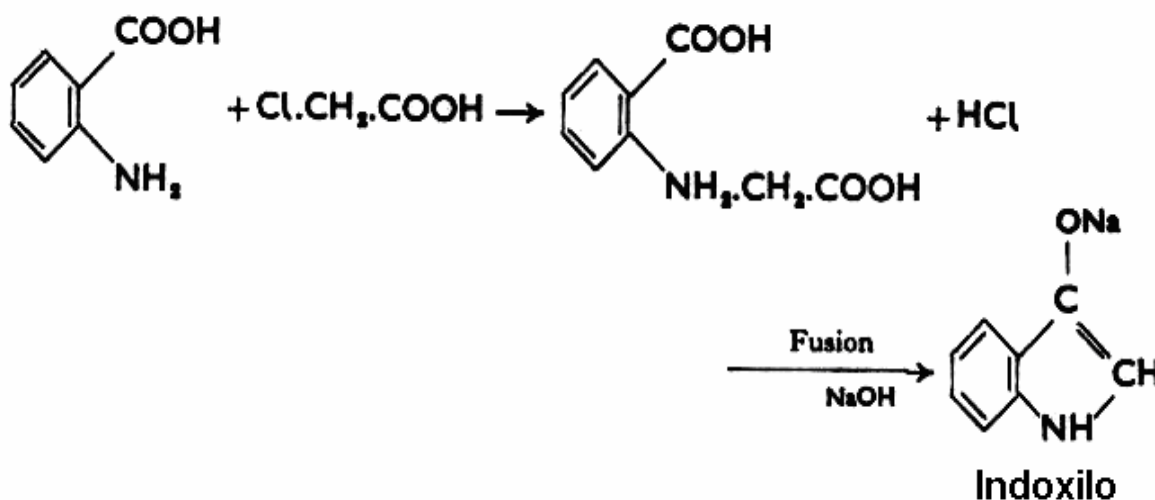


Figura I.25. Etapa final del procedimiento de síntesis química de índigo (Trotman, 1990)

Pfleger, químico de la Deutsche Gold-und Silver-Scheide Anstalt, constató que si se empleaba la amidura de sodio como agente de ciclización en lugar de la sosa o la potasa, partiendo de la fenilglicina, se obtenían excelentes rendimientos de indoxilo. De esta manera ya no era necesario pasar por el ácido antranílico, sino que se podía partir de la anilina (Matadamas-Ortiz, 2002).

A partir de esto se planteó un nuevo método para la manufactura del índigo, en el cual la sal sódica de fenilglicina-o-ácido carboxílico proveniente de la anilina se calentó con hidróxido de sodio al que se había adicionado una pequeña cantidad de sosamida, obteniéndose mejores rendimientos (Trotman, 1990, Murdock, 1994).

La secuencia de reacciones del método que se utiliza actualmente se ilustra a continuación en la Figura I.26.

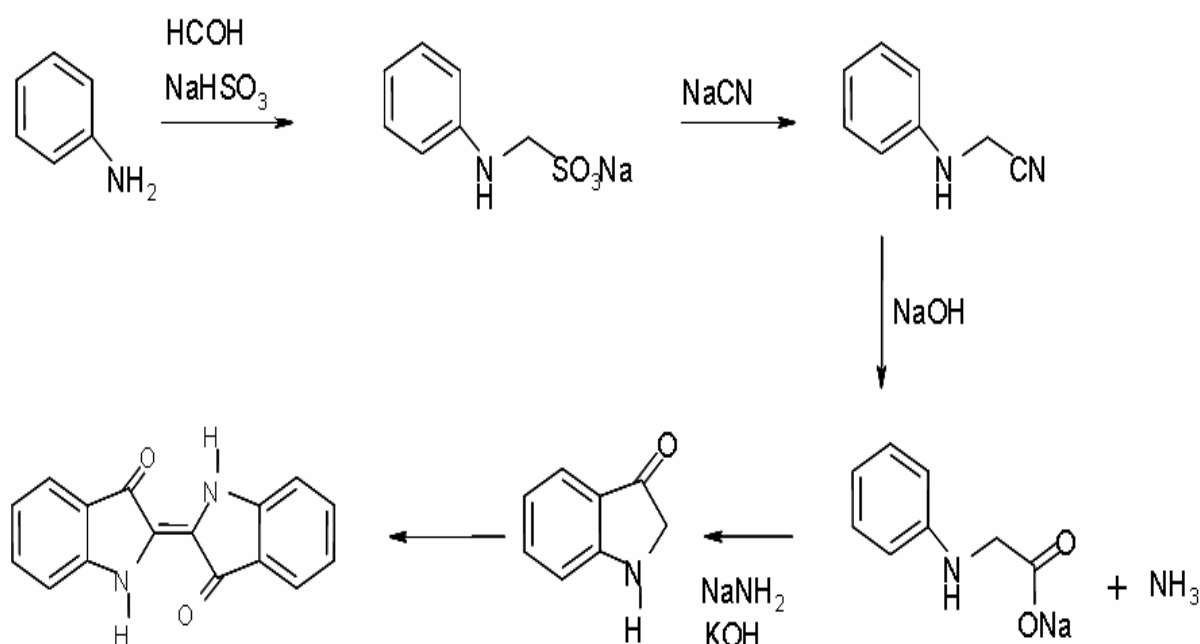


Figura I.26. Esquema de reacciones del proceso de síntesis química de índigo a partir de fenilglicina (Trotman, 1990)

Una tercera ruta es la preparación de β -hidroxietilanilina por la acción de clorhidrin-etileno sobre la anilina, el indoxilo se obtiene por fusión con hidróxido de sodio y óxido de calcio (Figura I.27).

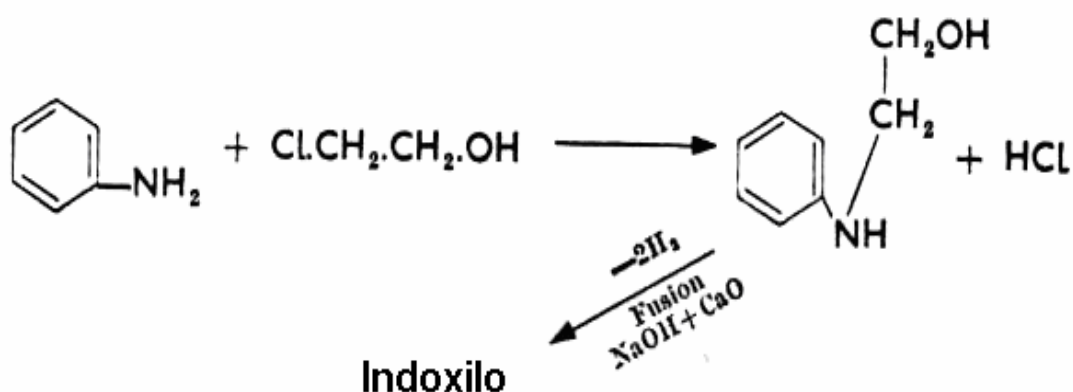


Figura I.27. Proceso alterno de síntesis química de índigo (Trotman, 1990)

I.5. Extracción de metabolitos empleando ultrasonido

Las ondas de sonido son vibraciones mecánicas en un sólido, líquido o gas. El ultrasonido tiene una frecuencia superior al rango audible por el humano (1-16 kHz). La frecuencia de ultrasonido más baja es normalmente 20 kHz y el rango superior de frecuencia está limitado por la capacidad para generar las señales. En algunos casos se han usado niveles de gigahertz (GHz; Luque-García and Luque de Castro, 2003).

La principal diferencia entre las ondas de sonido y las ondas electromagnéticas (ondas de radio, infrarrojo, visible, luz ultravioleta, rayos X, rayos gama) es que mientras las últimas pueden pasar a través del vacío, las ondas de sonido pueden viajar a través de la materia, provocando ciclos de expansión-compresión (Luque-García and Luque de Castro, 2003).

En un líquido el ciclo de expansión produce presión negativa. Si el ultrasonido es suficientemente fuerte el ciclo de expansión puede crear burbujas o cavitación en el líquido. Cuando la cavitación ocurre en un líquido cerrado o en la superficie de un sólido, la energía potencial de las burbujas expandidas se transforma en energía cinética que se refleja como chorros de agua que se mueven dentro de las burbujas y penetran la pared opuesta de la burbuja. Los chorros líquidos presentes sobre la superficie pueden tener velocidades de hasta 400 km/h. El impacto de los chorros sobre la superficie sólida es muy fuerte, causando daños serios sobre las zonas de impacto y produciendo nuevas zonas expuestas altamente reactivas (Vilarem *et al*, 1997; Luque-García and Luque de Castro, 2003, Entezari *et al*, 2004).

A nivel de laboratorio existen dos tipos de equipos (Vilarem *et al*, 1997):

- a) Las sondas de ultrasonido: son poco voluminosas, pero tienen el inconveniente de emitir una energía muy concentrada dentro de una superficie del orden de un centímetro cuadrado alrededor del sitio de la emisión. La concentración de la energía de emisión puede deteriorar ciertas moléculas a extraer. Como opciones para facilitar las operaciones de extracción se ha propuesto el uso de amplificadores y celdas de circulación.
- b) Los tanques y tinas equipados de un transductor ultrasónico. Existen de dos tipos: las tinas de limpieza utilizadas como sistemas de extracción y las tinas equipadas, diseñadas y dimensionadas con el único fin de utilizarse para la extracción.

En química analítica, la radiación de ultrasonido se usa como una potente herramienta para acelerar varios pasos en procedimientos analíticos, como el pretratamiento de muestras debido a que facilita y acelera las operaciones de extracción de compuestos orgánicos e

inorgánicos, dispersión de lodos, homogenización, nebulización, lavado y derivatización (Luque-García and Luque de Castro, 2003, Zuo *et al*, 2004 Alonso-Salces, 2005).

Recientemente, se ha incrementado la aplicación de ultrasonido en procesos de extracción y refinación. Se ha encontrado que puede mejorar significativamente la tecnología de extracción de pectinas y la producción de tinturas medicinales de plantas (Hromádkova and Ebringerová, 2003). En la industria alimenticia la ultrasonificación de alta intensidad puede acelerar el calentamiento y el transporte de masa en una variedad de operaciones. Se ha usado con éxito en el mejoramiento del secado, mezclado, homogenización, en el tratamiento de aguas y en la extracción sólido-líquido (Romdhane and Gourdon, 2002; Haizhou *et al*, 2004).

Se ha visto que el tratamiento con ultrasonido puede incrementar la actividad de algunas enzimas claves en las reacciones bioquímicas. Otra de las aplicaciones del ultrasonido es en el tratamiento de jugos y frutos. Se ha encontrado un incremento en el color, la viscosidad y el rendimiento de jugo de naranja. Por otro lado, la sonicación de uvas por 5-10 minutos mejora el sabor de vinos y su clarificación (Romdhane and Gourdon, 2002).

El ultrasonido se ha usado con éxito en la extracción de diferentes metabolitos de plantas, tales como compuestos activos farmacéuticamente, polisacáridos, flavonoides, hidrocarburos saturados, ácidos grasos, ésteres y esteroides (Schinor *et al*, 2004). La extracción de saponinas de ginseng mediante aplicación de ultrasonido ha permitido recuperar los rendimientos de extracción hasta en 30% (Hui and Masao, 1994). Asimismo, la aplicación de ultrasonido combinada con enzimas en la extracción de aceite de *Jatropha curcas* permitió incrementar el rendimiento de extracción y disminuir el tiempo de 18 a 6 horas (Shah *et al*, 2005).

Los principales efectos positivos del ultrasonido sobre la extracción son el incremento de la eficiencia y el acortamiento del tiempo de extracción. Shah *et al*, (2005) encontraron que estos efectos son el incremento de la transferencia de masa y un mayor acceso del solvente al contenido celular. Adicionalmente, el colapso de las cavidades cercanas a la pared celular puede provocar la disrupción celular liberando el contenido dentro del medio de extracción (Entezari *et al*, 2004).

Además de los efectos benéficos que ya se han mencionado, el empleo de ultrasonido permite cambiar las condiciones experimentales, para disminuir las temperaturas y las presiones. De este modo es posible mantener la calidad de solutos relativamente inestables (Schinor *et al*, 2004).

Para mantener la eficiencia de extracción se debe evitar que haya pérdidas de la energía dentro del medio de extracción (la dilución de la materia a extraer o la ausencia de agitación no permiten el paso dentro de la zona de eficiencia del transductor) o bien que la materia no obstaculice la extracción (La materia poco diluida puede absorber la totalidad de la energía emitida (Vilarem *et al*, 1997)).

CAPITULO II

ESTUDIOS DE CAMPO

INDICE DE CONTENIDO

- II.1. Preparación y germinación de las semillas**
- II.2. Selección del tipo de suelo y evaluación del crecimiento**
- II.3. Monitoreo de temperaturas y humedad relativa**
- II.4. Evaluación de la producción de colorante durante el ciclo de cultivo**
- II.5. Producción de índigo**
- II.6. Caracterización del crecimiento y de la producción durante el ciclo de cultivo**
- II.7. Conclusiones**
- II.8. Bibliografía**

CAPITULO II

ESTUDIOS DE CAMPO

II.1. Preparación y germinación de las semillas

Las semillas de la especie *Indigofera suffruticosa* Mill utilizadas en esta sección del trabajo se colectaron durante el invierno del año 2003 en la localidad de la Huerta, Jalisco, México. Después de la cosecha las semillas se secaron por exposición al sol y se les eliminó la cascarilla con la ayuda de un mortero (Figura II.1).



Figura II.1. Preparación de la semilla de añil para la siembra

Para obtener el índice de germinación, las semillas se sembraron en charolas de 200 cavidades (2.2 X 2.5 X 5.0 cm). En cada cavidad se depositaron diez semillas a una profundidad de 0.5 cm, posteriormente se incubaron en una instalación localizada cerca del sitio de cultivo, durante tres semanas con riegos a intervalos de dos días (Figura II.2).



Figura II.2. Aspecto de la germinación de plántulas en charolas

El porcentaje de germinación de las semillas obtenido por conteo directo del número de plantas por cavidad fue en promedio del 10%, este valor es muy bajo comparado con el 50% obtenido en pruebas preliminares realizadas a nivel de laboratorio, utilizando semillas del mismo origen cosechadas en un ciclo de cultivo anterior (Arias-Castro y Sandoval-Salas, 1999). Los resultados obtenidos también fueron menores a los reportados por Farah *et al* (1988) en *Isatis tinctoria*, quienes obtuvieron valores del 76-99%, atribuibles a variaciones climáticas.

El porcentaje bajo de germinación podría deberse a que las semillas se almacenaron durante cuatro meses y a que la humedad relativa de la región es alta (arriba del 50%). Por otra parte, las semillas se germinaron bajo condiciones de campo, en donde no es posible controlar las condiciones ambientales. Un estudio presentado por Villers (1979) demostró una reducción en el porcentaje de germinación de semillas de algodón del 93 al 90%, después de dos años de almacenamiento a muy baja humedad (7%), sin embargo cuando la humedad aumentó el porcentaje se redujo a 87% (11% de humedad) y en casos extremos llegó al 0% (14% de humedad). De acuerdo a lo reportado por Bryant, (1985), la ruptura de la dormancia o reposo de las semillas requiere de condiciones apropiadas de luz, temperatura y humedad las cuales dependen de cada especie.

II.2. Selección del tipo de suelo y evaluación del crecimiento

En las primeras pruebas de campo los cultivos se iniciaron por trasplante de las plántulas germinadas en charola (Figura II.3). Sin embargo, después de dos meses se observó que no había desarrollo foliar y que muchas de las plántulas se secaban. Es probable que esto se deba al estrés del trasplante. A partir de estos resultados se decidió iniciar los cultivos germinando las semillas directamente en campo.



Figura II.3. Plántulas de añil de 70 días de edad cultivadas en charolas de germinación

Para la preparación del terreno se realizaron dos barbechos, un surcado y un riego. La siembra se hizo depositando en la parte media del surco aproximadamente diez semillas a una profundidad de 1 a 2 cm y a distancia entre plantas de 25 cm (50,000 plantas/ha).

Se establecieron dos cultivos: uno en una parcela con suelo de textura areno-arcillosa y el otro en una parcela con suelo de textura limosa ubicadas, en el Municipio de Naolinco, Veracruz México (a aproximadamente 800 m.s.n.m.). Ambos cultivos se manejaron bajo condiciones de temporal y se hicieron deshierbes en forma manual cada dos semanas.

La germinación en campo de los cultivos inició una semana después de la siembra. A partir de este momento se evaluó el desarrollo de las plantas en altura mediante muestreos semanales, en los que se seleccionaron y midieron 10 plantas de cada uno de los cultivos en forma aleatoria. También se evaluó el crecimiento en biomasa por planta a partir del peso seco de las hojas, el cual se determinó en el laboratorio inmediatamente después de la cosecha y el transporte de la muestras.

Los resultados de desarrollo y crecimiento obtenidos en los cultivos de añil se presentan en las Figuras II.4 y II.5. Asimismo, en la Figura II.6 se presenta el aspecto de los cultivos de añil durante el crecimiento.

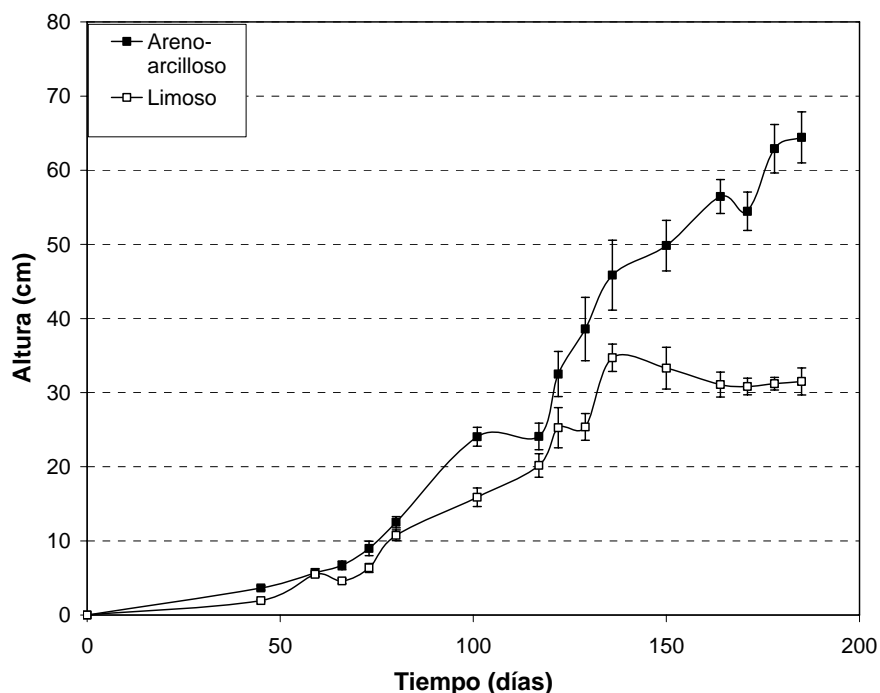


Figura II.4. Incremento en altura de las plantas de añil durante el ciclo de cultivo, en dos diferentes tipos de suelo

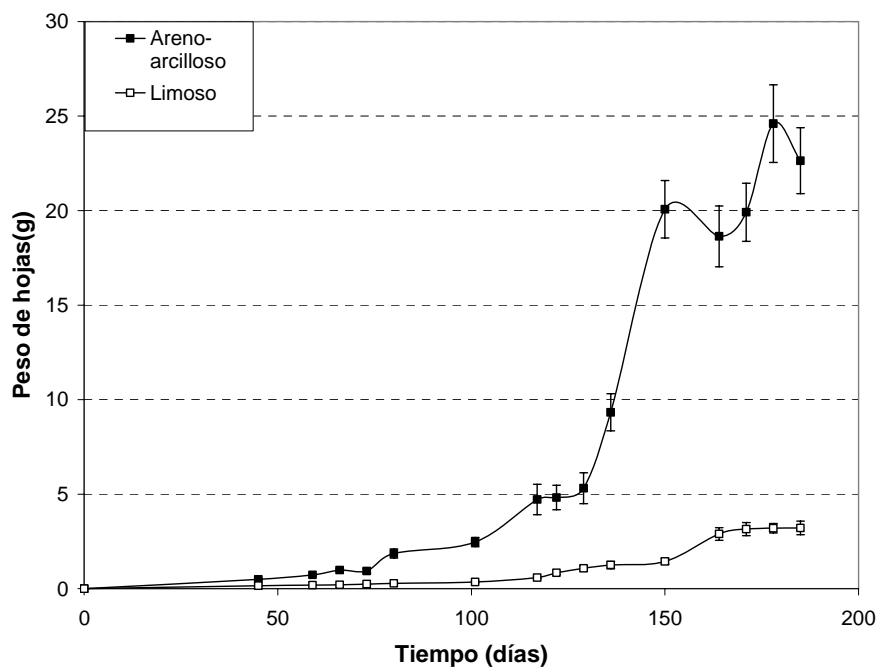


Figura II.5. Evolución del crecimiento de cultivos de añil durante el ciclo de cultivo en dos diferentes tipos de suelo



Figura II.6. Aspecto de los cultivos de añil durante el crecimiento a los 120 días después de la siembra

A partir de estos resultados se calcularon las velocidades de crecimiento específicas mediante la linearización de los datos graficando el tiempo contra el logaritmo natural de la altura y del peso de hojas (Tabla II.1) y se determinó la presencia de tres etapas de crecimiento así como su duración.

Tabla II.1. Velocidades de crecimiento en campo de cultivos de añil

Etapa	Altura (cm)			Peso de hojas (g)			
	Días	Velocidad de crecimiento (d^{-1})		Días		Velocidad de crecimiento (d^{-1})	
		Arenoso	Arcillo-limoso	Arenoso	Arcillo-limoso	Arenoso	Arcillo-limoso
Inicial	0-45	ND	ND	0-45	0-45	ND	ND
Exponencial	45-136	0.0271	0.0280	45-150	45-164	0.0326	0.0242
Estacionaria	136-185	0.0070	0.0023	150-185	164-185	0.0073	0.0046

ND: Valores no determinados

Las tres etapas del desarrollo de los cultivos de añil mencionadas con anterioridad mostraron las siguientes características:

a) Inicial.

Durante los primeros cuarenta y cinco días se observaron únicamente plántulas con cotiledones con una altura promedio de 3.65 cm y eventualmente algunos brotes de hojas. El crecimiento radicular durante esta etapa fue mucho mayor que el crecimiento de la zona aérea de la planta (aprox. 20 cm).

b) Exponencial.

En todos los casos la fase de crecimiento exponencial inició a los 45 días. Las plantas dejaron de desarrollarse en altura a los 136 días en ambos tipos de suelo, esta detención del crecimiento coincide con la disminución de la temperatura ambiente (Figura II.8).

De acuerdo a lo reportado por Ku (1997), los suelos para el desarrollo de las plantas de añil deben ser de textura limosa, ya que los suelos arenosos y arcillosos no brindan las condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron lo contrario. El desarrollo máximo de los cultivos crecidos en suelo limo-arcilloso fue 50% menor que el obtenido en cultivos creciendo en suelo arenoso; el tamaño de las hojas también fue menor en las plantas cultivadas en suelo arcillo-limoso. Este comportamiento probablemente se deba a la limitación en desarrollo del sistema radicular. Para corroborar esto, se arrancaron algunas plantas que estaban creciendo en los tipos de suelo y se comparó el tamaño de su raíz, encontrándose menor desarrollo en el suelo limo-arcilloso (aprox. 50%). Por otro lado, durante la experimentación se detectó que este tipo de suelo presentaba encharcamiento durante el riego debido a deficiencias en el drenaje. Es probable que este comportamiento haya limitado el intercambio gaseoso de las raíces y provocado la disminución del crecimiento.

Las plantas cultivadas en suelo arenoso se desarrollaron verticalmente durante los primeros cinco meses. Durante esta etapa se alcanzó 60% de su altura final, mientras que las ramificaciones y el desarrollo foliar fueron incipientes (Figura II.5). Posteriormente se observó un mayor desarrollo horizontal, lo cual se reflejó en la biomasa cosechada que se duplicó en 20 días. El desarrollo en altura se detuvo al inicio de la floración.

Como consecuencia del desarrollo incipiente de los cultivos establecidos en suelo limo-arcilloso, la evaluación de la producción de colorante se realizó únicamente en los cultivos establecidos en suelo arenoso.

c) Estacionaria.

Se presentó cuando disminuyó la velocidad de crecimiento de los cultivos a los 136 y 150 días para desarrollo y crecimiento respectivamente.

II.3. Monitoreo de temperaturas y humedad relativa

La humedad relativa en la región es alta. Durante el ciclo de cultivo se mantuvo siempre arriba del 60%, alcanzando en algunas ocasiones hasta 98% (Figura II.7). Esta característica facilitó las operaciones de cultivo debido a que la mayor parte del tiempo el suelo se mantuvo húmedo, por lo que no fue necesario realizar riegos.

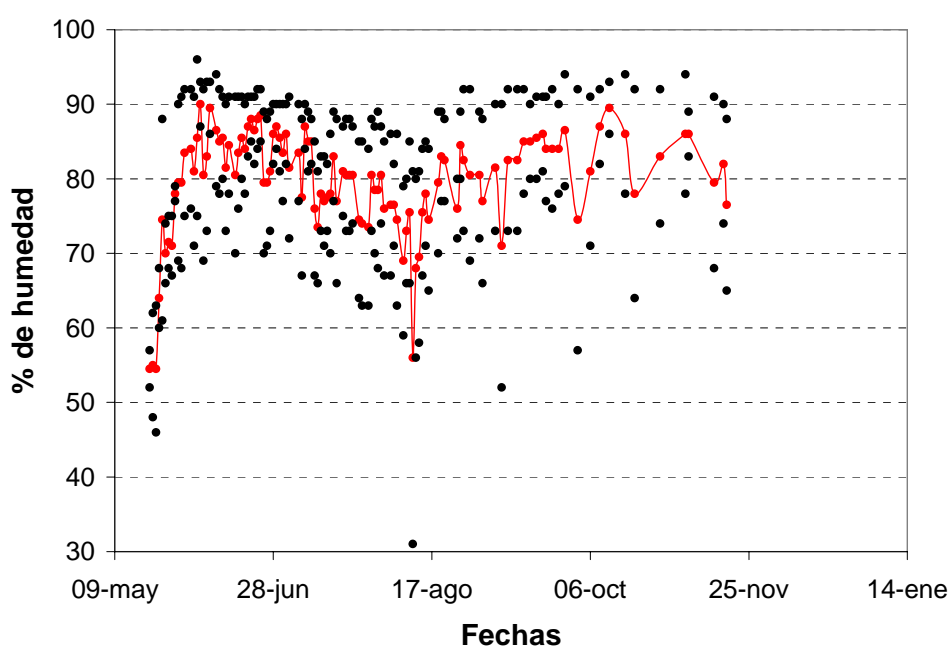


Figura II.7. Monitoreo de la humedad relativa durante el ciclo de cultivo de añil. La línea continua representa las medias de humedad relativa y los puntos los valores de humedad relativa máximos y mínimos durante el día

Las temperaturas medias durante los primeros cinco meses estuvieron arriba de los 20°C con fluctuaciones entre 15 y 30°C (Figura II.8), Durante el último periodo de cultivo la temperatura descendió principalmente durante la noche. Este período coincidió con la disminución de la velocidad de crecimiento de los cultivos.

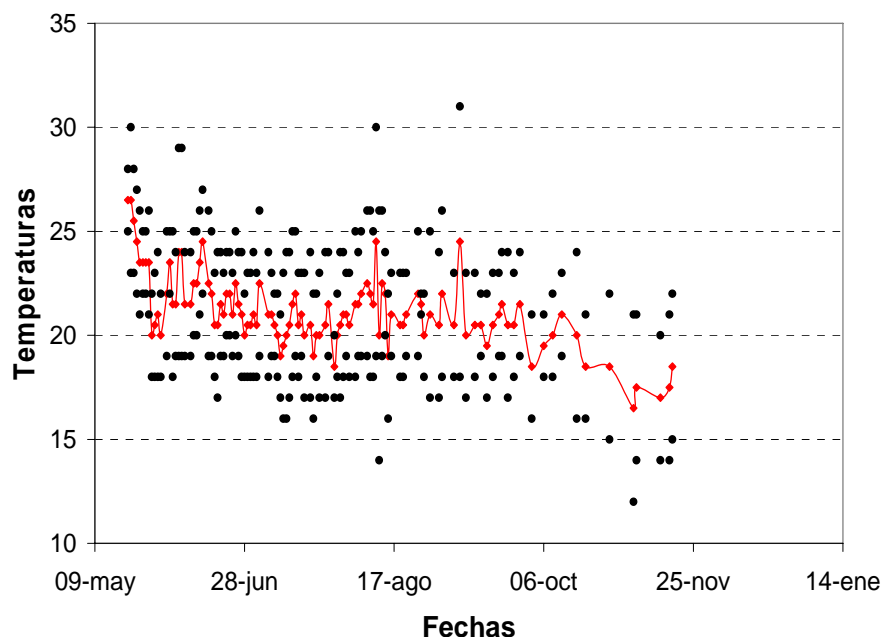


Figura II.8. Monitoreo de la temperatura durante el ciclo de cultivo de añil. La línea continua representa las temperaturas medias y los puntos la temperatura máxima y mínima durante el día.

II.4. Evaluación de la producción de colorante durante el ciclo de cultivo

Como se mencionó previamente, la evaluación de la producción se realizó únicamente en plantas provenientes del cultivo establecido en suelo arenoso.

Con la finalidad de contar con material suficiente para los análisis del Colorante Azul en Polvo (CAP), las primeras determinaciones se hicieron después de que las plantas alcanzaron una producción de biomasa superior a 10 g/planta, después de los 118 días de cultivo (Figura II.5).

La extracción del colorante se realizó en matraces Erlenmeyer de 2L por el método EC1 descrito en el Capítulo V. En esta sección experimental se partió de material fresco, por lo que fue necesario incrementar el tiempo de extracción a 12 horas a temperatura de 25° C. La relación materia vegetal:H₂O utilizada en esta sección fue 1:5. Se utilizaron muestras de 20-50 g de hojas dependiendo de la fecha de muestreo.

Los rendimientos de CAP en las hojas obtenidos durante los muestreos se presentan en la Figura II.9. El contenido del CAP en las hojas se incrementó a partir del tercer muestreo. Aparentemente, los rendimientos más altos se presentan durante la fase de crecimiento

entre los días 136 a 150 y posteriormente disminuyen durante la fase estacionaria (Tabla II.1).

Sin embargo, mediante el análisis de varianza de los resultados (Tabla II.2; Infante y Zarate, 1997) y la comparación de medias por el método de Tukey (Figura II.10; Steel y Torrie, 1993) se determinó con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ que no existe diferencia significativa en el rendimiento de CAP entre el periodo comprendido entre los días 136 y 172, el cual corresponde a la etapa de crecimiento exponencial y parte de la estacionaria. Después de este periodo sí se observa una disminución en el contenido CAP en las hojas.

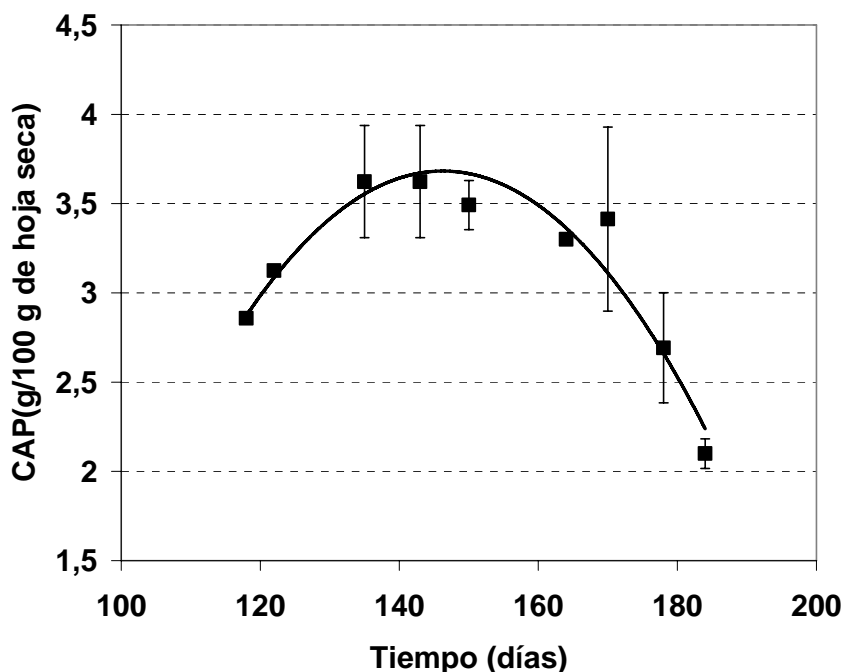


Figura II.9. Contenido de CAP en las hojas de añil durante el ciclo de cultivo

Tabla II.2. Análisis de varianza del rendimiento de CAP a diferentes fechas de cosecha.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Tratamiento	8	6.20	0.7747	3.97
Error	18	3.51	0.1951	
Total	26	9.71		

Ho: Los rendimientos de CAP son iguales en todos los muestreos

Ha: Al menos uno de los muestreos presenta diferencias

Regla de decisión: Rechazar Ho si $F_o \geq F^8_{18,05}$

$F^8_{18,05} = 2.5$

Conclusión: Se rechaza Ho. Existen diferencias en el contenido de CAP en los muestreos.

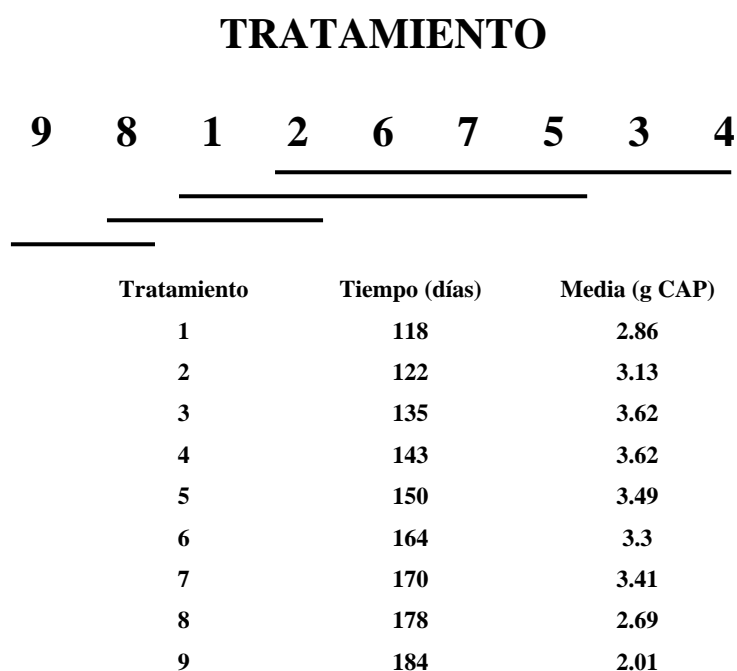


Figura II.10. Comparación de medias de CAP por el método de Tukey.

II.5. Producción de índigo

Para la determinación de la concentración de índigo en el CAP en cada uno de los muestreos se utilizó el método de HPTLC- Densitometría descrito en la el Capitulo V (DI-1).

El contenido de índigo en el CAP fue mayor o igual al 30% durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos y disminuyó ligeramente al entrar en la fase estacionaria, En la última etapa de cultivo, el contenido bajo a menos del 20% (Figura II.11).

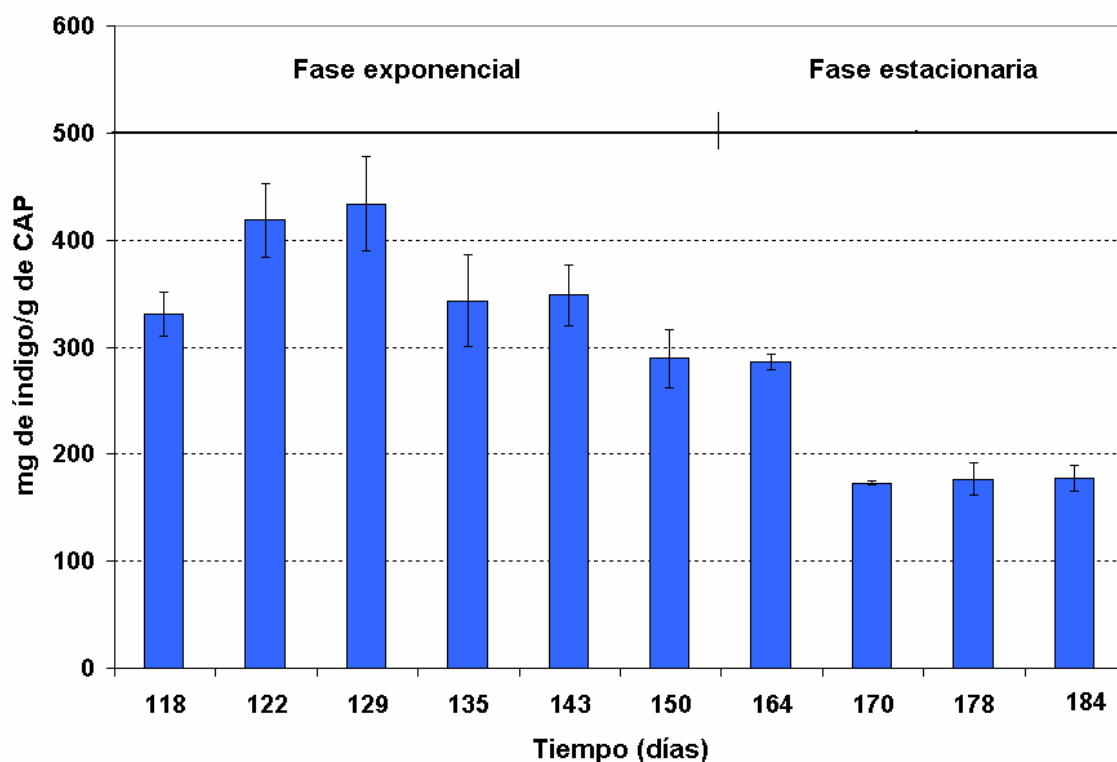


Figura II.11. Concentración de índigo en el CAP durante el ciclo de cultivo de añil

El efecto de la fecha de cosecha fue más evidente en los rendimientos obtenidos de índigo durante el ciclo de cultivo de las plantas de añil (Figura II.12).

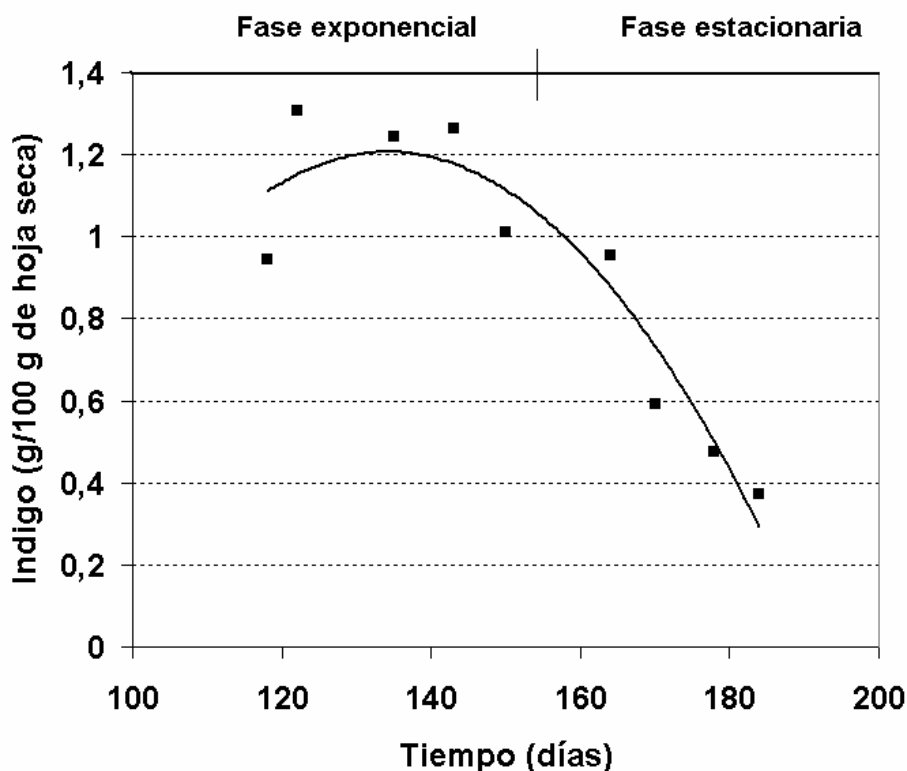


Figura II.12. Rendimientos de índigo en las hojas de plantas de añil durante un ciclo de cultivo

El análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos durante la etapa de crecimiento exponencial y la fase estacionaria ($\alpha = 0.05$; Tabla II.3, Figura II.13).

La concentración máxima de índigo (media = 1.12 g/100 g de hoja seca), coincidió con el inicio de la floración, se mantuvo mientras continuo el crecimiento y disminuyó durante la fase estacionaria. Este comportamiento esta de acuerdo con lo reportado por Gilbert and Cooke (2001), en relación a que en la mayoría de las plantas, los metabolitos secundarios del tipo del índigo se producen naturalmente durante el crecimiento. Debido a que a energía que requieren sus procesos de biosíntesis proviene de la radiación del sol, principalmente de la sección del espectro fotosintéticamente activa.

Tabla II.3. Análisis de varianza del rendimiento de índigo a diferentes fechas de cosecha

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Tratamiento	8	2.23	0.2789	4.3289
Error	16	1.03	0.0644	
Total	24	3.26		

Ho: Los rendimientos de índigo en las hojas son iguales en todos los muestreos

Ha: Al menos uno de los muestreos presenta diferencias

Regla de decisión: Rechazar Ho si $F_o \geq F^8_{16,0.05}$

$F^8_{16,0.05} = 2.59$

Conclusión: Se rechaza Ho. Existen diferencias en el rendimiento de índigo en las hojas en los diferentes muestreos.

TRATAMIENTO

9 8 7 1 6 5 3 4 2

Tratamiento	Tiempo (días)	Media (g índigo)
1	118	0.9457
2	122	1.3083
3	135	1.2440
4	143	1.2623
5	150	1.0115
6	164	0.9530
7	170	0.5908
8	178	0.4755
9	184	0.3727

Figura II.13. Comparación de medias de CAP por el método de Tukey

En algunos estudios realizados con la especie *Polygonum tinctorium* se ha mostrado que la acumulación de la enzima β -glucosidasa que cataliza la hidrólisis de indicán durante la formación de índigo se presenta en los cloroplastos de las hojas y que el precursor indicán se acumula en vacuolas (Minami et al, 1997, 2000). Adicionalmente se ha encontrado que la producción de índigo en algunas especies disminuye cuando las plantas se desarrollan bajo cantidades reducidas de luz, y en presencia de mayor cantidad de luz se pueden incrementar hasta 10 veces los rendimientos (Gilbert and Cooke, 2001). Hasta ahora no existen reportes que mencionen cuál es el sitio de acumulación intracelular de los precursores de índigo en las plantas de añil, pero de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y los reportes de las investigaciones realizadas con otras especies, es posible que los precursores se encuentren también almacenados en vacuolas y que las enzimas que catalizan su hidrólisis estén asociadas a los cloroplastos.

II.6. Caracterización del crecimiento y la producción durante el ciclo de cultivo

Con anterioridad se ha resaltado la importancia de contar con información acerca de la dependencia del tiempo de cultivo de las plantas productoras de índigo que sirva como base para optimizar la cosecha, el almacenamiento del material vegetal y la extracción y formación de precursores de índigo (Bechtold *et al.*, 2002). En el caso del añil existe entre los productores la creencia de que hay una relación entre la secreción de un líquido blanquecino al cortar los brotes y el momento adecuado para realizar la cosecha, debido a que la concentración de colorante es más alta en este momento; sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron la presencia de colorante desde etapas tempranas del desarrollo y en ninguna de las cosechas se detectó la presencia de la secreción blanca mencionada con anterioridad.

Con base en los resultados anteriores y tomando en consideración la densidad de siembra de los cultivos, se estimó la producción de colorante y de índigo por hectárea durante el ciclo de cultivo (Figura II.14).

Los rendimientos máximos de CAP se alcanzaron aproximadamente a los 150 días de cultivo, al inicio de la fase estacionaria de crecimiento (durante el mes de octubre) y se mantuvieron durante aproximadamente un mes. Mientras que los rendimientos máximos de índigo también alcanzaron su máximo en este periodo, pero se mantuvieron por menos tiempo.

La caracterización del crecimiento de los cultivos de añil establecidos en este trabajo se ilustra en la Figura II.15. Cada una de las etapas del crecimiento se asocia al número de días transcurridos después de la siembra y al mes del año en el se presentaron. En esta Figura se destaca la importancia que tiene el periodo en que se realiza la cosecha sobre la producción índigo.

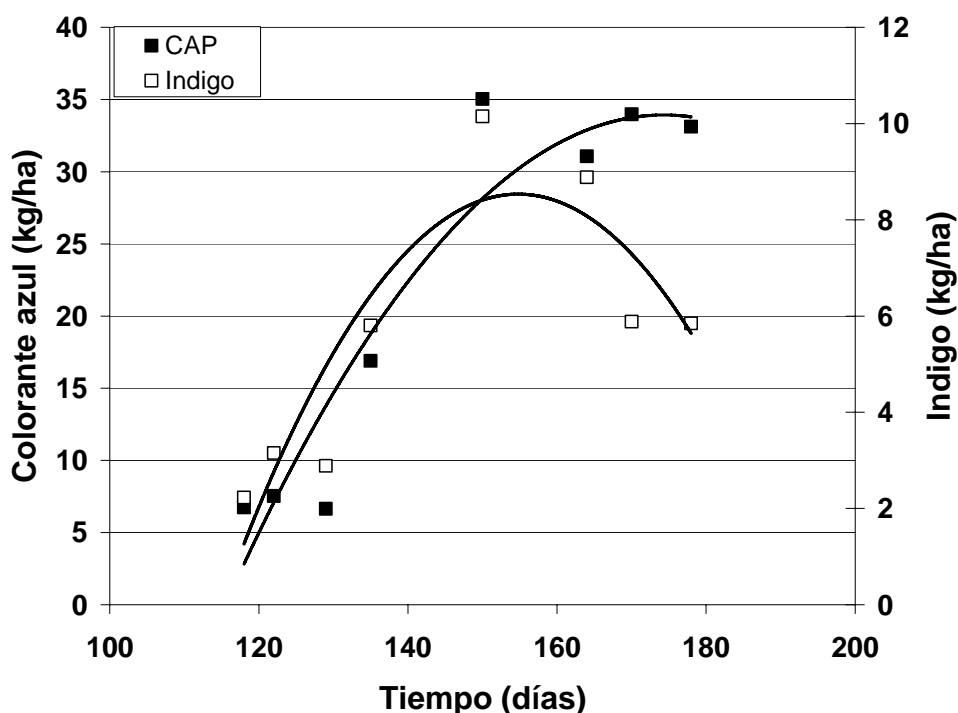


Figura II.14. Rendimientos de colorante y de índigo por hectárea durante el cultivo de plantas de añil

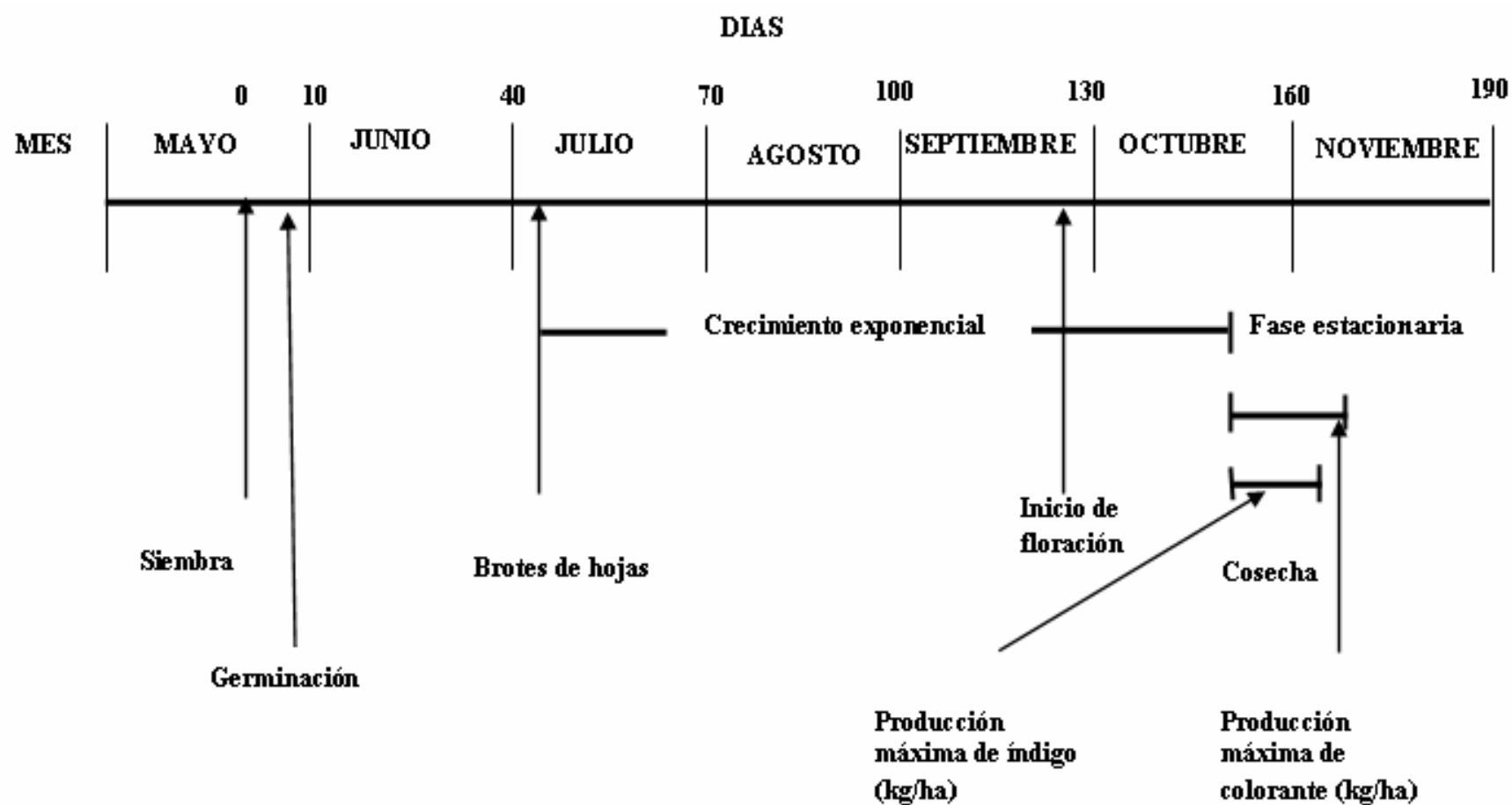


Figura II 15. Representación esquemática del ciclo de cultivo de añil en la que se indica cada una de las etapas del crecimiento y producción relacionadas con la edad de la planta y el mes en el que se presentan.

II.7. Conclusiones

- El porcentaje de germinación en campo de las semillas de añil fue del 10%. Este valor es más bajo que el obtenido en trabajos previos en los que se realizó la germinación en laboratorio.
- Durante el desarrollo de las plantas de añil se presentaron tres etapas: una fase inicial de crecimiento lento, la cual tuvo una duración de 45 días. Posteriormente, entre los 45 y 165 días después de la siembra hay una fase de crecimiento exponencial y finalmente, una fase estacionaria en la que se observó detención del crecimiento.
- El crecimiento en altura, en desarrollo foliar y radicular fue mejor en los cultivos establecidos en suelo de textura arenosa respecto a los de textura arcillo-limosa.
- La disminución en la temperatura ambiental se reflejó en una disminución de la velocidad de crecimiento de las plantas de añil.
- Los rendimientos más altos de CAP en las hojas se obtuvieron durante la etapa de crecimiento exponencial y disminuyeron durante la fase estacionaria en tanto que, los valores más altos del contenido de índigo en las hojas coincidieron con el inicio de la floración, se mantuvieron mientras continuó el crecimiento y disminuyeron durante la fase estacionaria.
- Tomando como base los rendimientos por hectárea de CAP e índigo, se determinó que la etapa más apropiada para realizar la cosecha de añil durante el primer ciclo de cultivo es al final de la fase de crecimiento exponencial, la cual se presentó aproximadamente a los 150 días después de la siembra, durante el mes de octubre.

CAPITULO III

ESTUDIOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LOS TEJIDOS DE LAS HOJAS DE AÑIL

INDICE DE CONTENIDO

III.1. Morfología de las hojas de añil

III.2. Tratamiento con amoníaco

III.3. Conclusiones

III.4. Bibliografía

CAPITULO III

ESTUDIOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LOS TEJIDOS DE LAS HOJAS DE AÑIL

III.1. Morfología de las hojas de añil

En esta sección, las hojas de añil se incluyeron en parafina de acuerdo al procedimiento descrito en la sección V.7.1 y se realizaron cortes transversales en el micrótom. Posteriormente los cortes se tiñeron con safranina y verde de Malaquita y se observaron en el microscopio óptico.

En la Figura III.1 se presenta la microfotografía de un corte transversal de la hoja de añil en la que se observan los tejidos típicos presentes en especies dicotiledóneas (Weier *et al*, 1983; Esau, 1985). En la región superior correspondiente al haz de la hoja, se localiza una capa de células de la epidermis e inmediatamente después se observan varias capas de células del parénquima en empalizada. Del lado del envés de la hoja se presenta una región de tejido parenquimatoso esponjoso, la cual es más delgada que la correspondiente al parénquima en empalizada. Estas células no alcanzan a diferenciarse de la epidermis del envés.

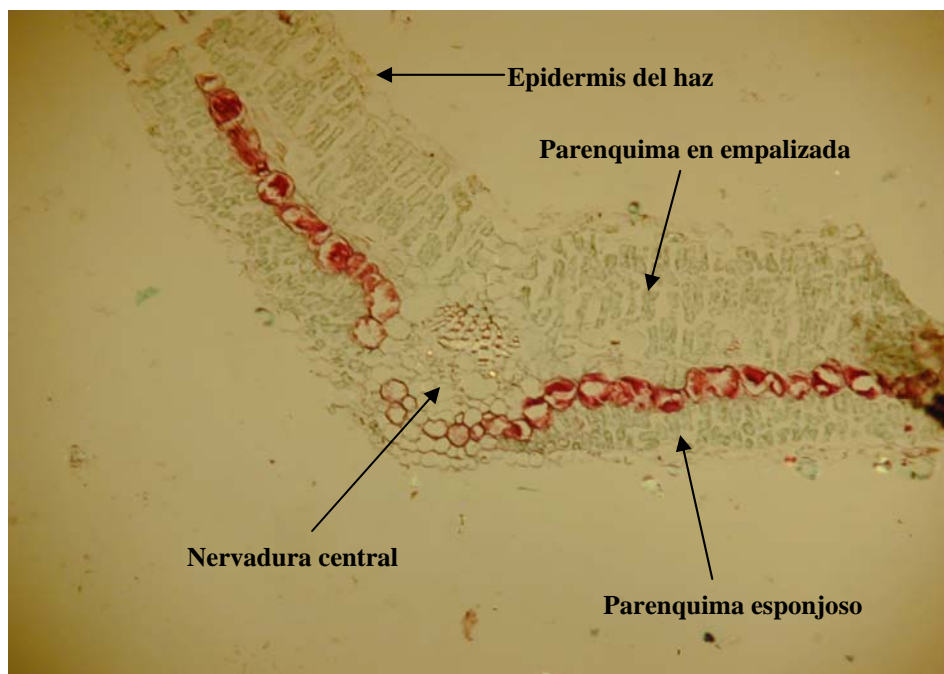


Figura III.1. Corte transversal de hoja de añil en el que se observan los diferentes tejidos. Realizado por inclusión en parafina. Objetivo 20 X

La sección central del corte corresponde a la nervadura principal de la hoja. La ampliación de esta sección (Figura III.2) mostró la presencia de células pequeñas acomodadas en forma de rosario formando un semicírculo, correspondientes a los haces vasculares del xilema, los cuales se conoce que en las venas mayores tienden a acomodarse hacia la superficie superior de la hoja, mientras que las células que se encuentran debajo de esta sección corresponden al floema o a células parenquimatosas no especializadas (Weier *et al*, 1983).

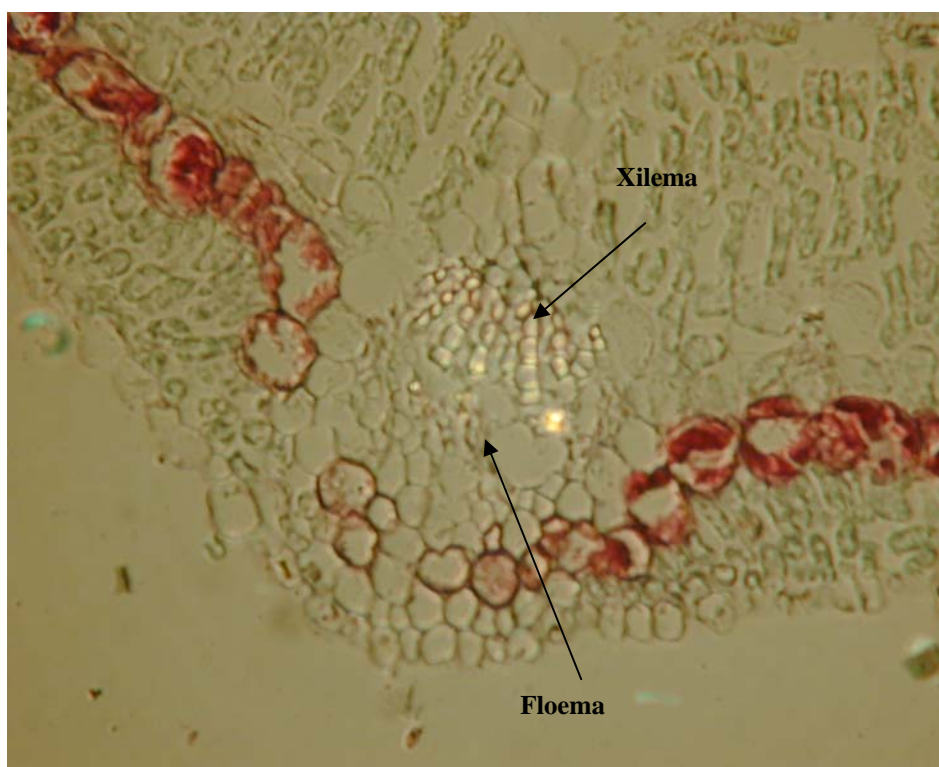


Figura III. 2. Corte transversal de la región central de la hoja de añil en la que se observa el tejido de la nervadura principal. Objetivo 40X

En ninguno de los cortes anteriores se observó la presencia de estomas (estructuras involucradas en la transpiración y respiración) ni de tricomas.

Entre el parénquima en empalizada y el esponjoso se observó una capa de células vacuoladas muy grandes, las cuales presentaban una coloración roja que contrastaba con el resto de los tejidos (Figuras III.1, III.2, y III.3). Esta misma capa se observó en un corte trasversal de hoja en fresco realizado en forma manual (Figura III.4.), a diferencia de los anteriores las células presentan una apariencia incolora.

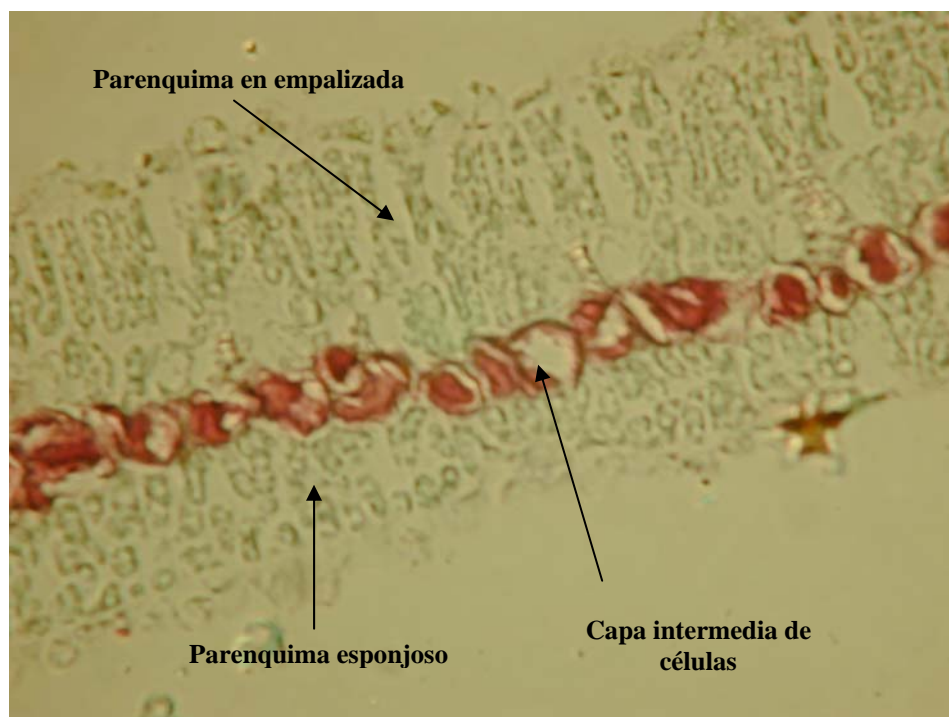


Figura III.3. Detalle de un corte transversal de hoja de añil en el que se observa la capa de color rojo que divide al parénquima en empalizada del esponjoso. Objetivo 40 X

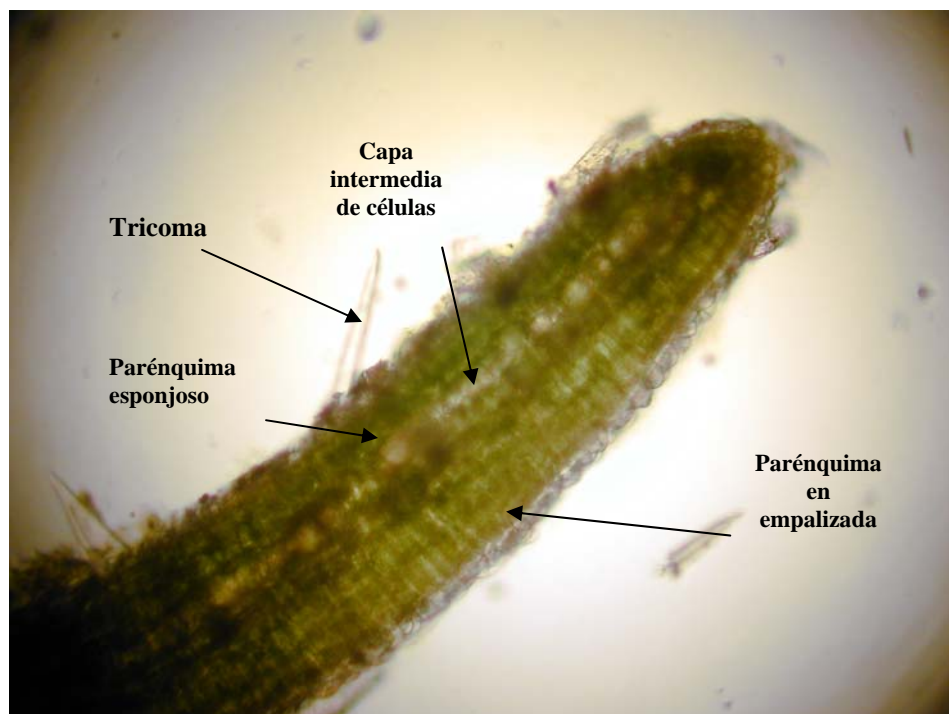


Figura III.4. Corte transversal de la hoja de añil realizado en forma manual. Objetivo 10X

La coloración rojiza de las células podría ser consecuencia de la metodología de tinción empleada, pero también podría deberse a alguna transformación bioquímica ocurrida durante la preparación de las muestras, que favoreció que el precursor de la formación del índigo, el indicán (incoloro) se hidrolizara y se oxidara para formar indirrubina (de color rojo a púrpura). Con anterioridad se ha mencionado que bajo ciertas condiciones oxidantes el indoxilo liberado después de la hidrólisis del indicán puede formar isatina, la cual se condensa con otra molécula de indoxil y forma la indirrubina (Stoker *et al*, 1998). Por otra parte, en un reporte previo a este trabajo Minami *et al* (2000) mencionan que la acumulación del indican en otras especies vegetales productoras de índigo tiene lugar en las vacuolas. Es posible que en la especie del género *Indigofera* el indicán también se acumule en este tipo de estructuras presentes en las células que se observan alineadas en forma de rosario dentro del mesófilo de las hojas.

III.2. Tratamiento con amoniaco

Con la finalidad de detectar el sitio probable de acumulación de los precursores de la formación de índigo en plantas de añil antes de hacer los cortes las hojas de añil, se incubaron en una cámara de vidrio saturada con vapores de amoniaco durante 24 horas.

Los resultados obtenidos con anterioridad mostraban la posibilidad de que el método de inclusión en parafina provocara cambios bioquímicos en la composición de las hojas, por esta razón se utilizó como medio de inclusión polietilenglicol (PEG), de acuerdo al procedimiento descrito en la sección V.7.2.

Los cortes obtenidos (Figuras III.5 y III.6) permitieron observar con mayor precisión la epidermis del haz y del envés de la hoja y distinguirlas de las capas del parénquima esponjoso y en empalizada, debido a que hay menor presencia de cloroplastos en estas zonas por lo que se observan de color verde más claro. Sin embargo, al igual que en los cortes obtenidos por inclusión en parafina, se observó entre los dos tipos de parénquima la presencia de la capa de células de color rojo.

Mediante el método de inclusión en PEG no se presentó plasmólisis, lo que permitió obtener imágenes más reales de la apariencia de las células de color rojo, las cuales indican que se trata de estructuras especializadas de acumulación de metabolitos, constituidas principalmente de vacuolas.

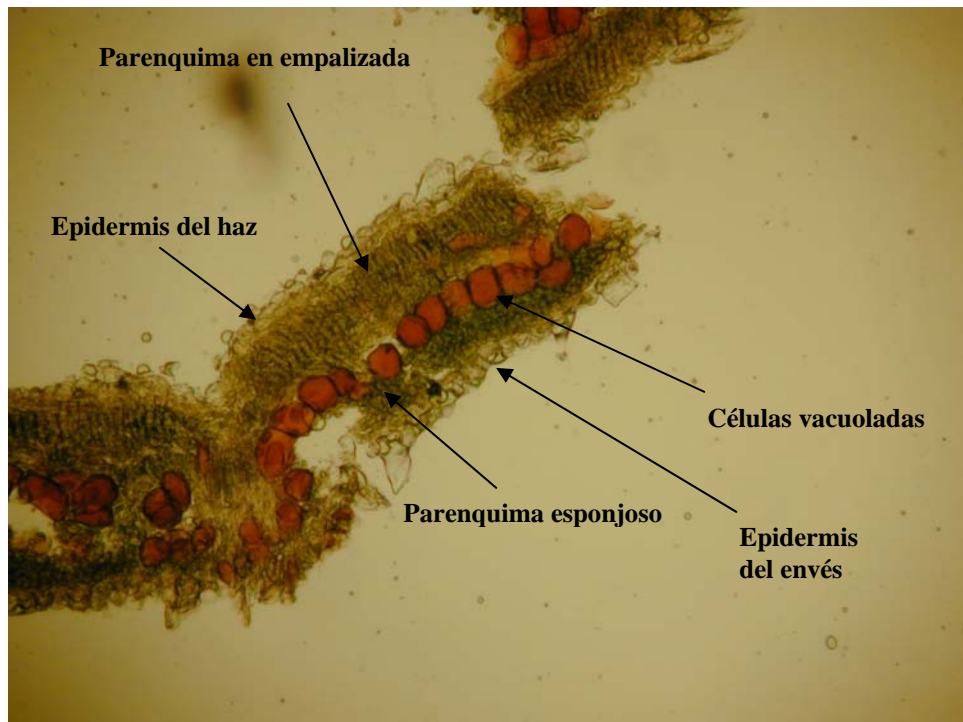


Figura III.5. Corte transversal de hojas de añil tratadas con amoniaco e inclusión en PEG. Objetivo 10 X

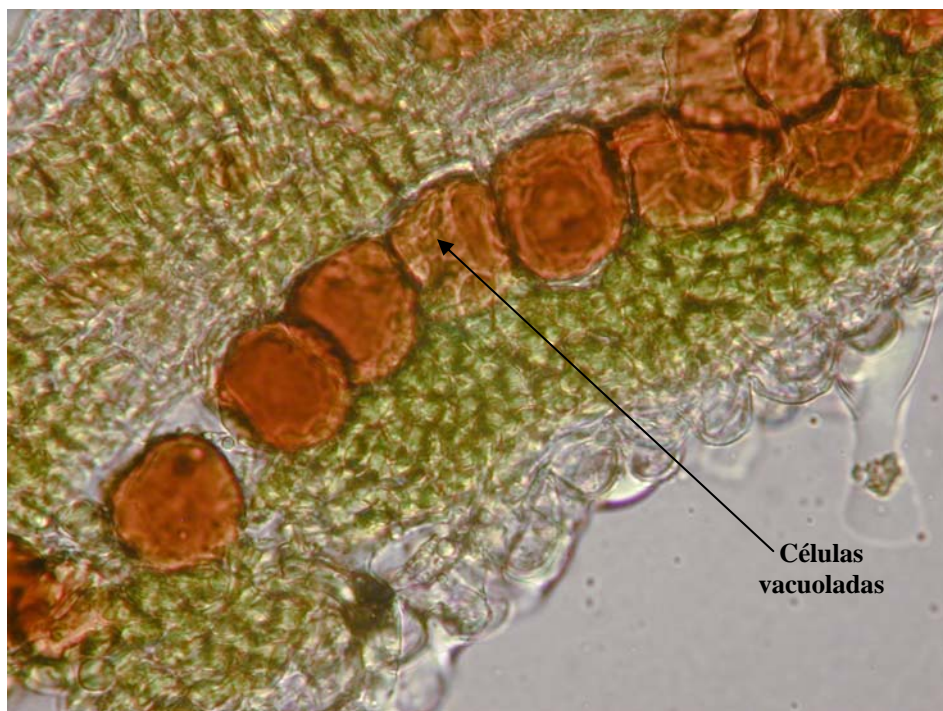


Figura III.6. Corte transversal de hojas de añil tratadas con amoniaco e inclusión en PEG. Objetivo 40 X

Como puede observarse en la Figura III.6, las células de almacenamiento son muy grandes respecto a las del resto del tejido y la capa de células que forman, representa una gran proporción respecto al área total del corte transversal de la hoja, lo que habla de la importancia para la planta del metabolito que guardan estas células. Debido a que en esta etapa no se utilizó ningún agente de tinción, se descartó la posibilidad de que la coloración roja se deba al procedimiento de preparación de las muestras. Este resultado respalda la teoría de que probablemente estas células almacenen indicán.

De acuerdo lo reportado por Hurry (1974) las hojas frescas de la especie *Isatis tinctoria* incubadas en vapor de amonio desarrollan una coloración azul intensa, la cual se observa mejor después de la extracción de la clorofila con alcohol. Aunque en el caso de las pruebas realizadas con hojas de la especie *Indigofera*, las hojas se tornaron de color azul intenso, las observaciones al microscopio permitieron determinar que no hay precipitación de índigo dentro de los tejidos. Aunque este resultado podría respaldar la teoría de que la hidrólisis de los precursores da como resultado la formación de indirrubina, es necesario considerar las diferencias que existen en cuanto a la hidrólisis y oxidación de los precursores de la formación de índigo en *Isatis tinctoria* y en *Indigofera*, ya que mientras en el primer caso el proceso tiene lugar bajo condiciones alcalinas y oxidantes, en el segundo caso se requiere la presencia de una enzima para hidrolizar el enlace glucosídico de naturaleza éter (Kokubun, *et al*, 1998).

Para corroborar este resultado una solución de estándar de indicán (SIGMA, 50 mM) disuelto en agua se incubó durante 24 horas en presencia de vapores de amoniaco. Simultáneamente, se preparó otra muestra de indicán a la misma concentración (50mM) y se hidrolizó por vía enzimática utilizando una enzima β -glucosidasa de almendras (SIGMA), de acuerdo al procedimiento descrito por Angelini *et al* (2003). Posteriormente las muestras se incubaron en agitación durante una hora para favorecer la oxidación y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm. La absorbancia de la muestra tratada con amoniaco fue similar a la obtenida en la solución usada como blanco de referencia (agua destilada), mientras que la absorbancia de la muestra tratada por vía enzimática fue de 0.15, lo cual demuestra que el amoniaco no hidroliza el enlace glucosídico del indicán.

Es posible que los compuestos almacenados en las células vacuoladas presentes en mesófilo de las hojas de añil sean de naturaleza fenólica, tales como los taninos.

La extracción y cuantificación de los taninos a partir de hojas secas de añil se llevó a cabo por el método de la vainillina descrito por Deshpande and Cheryan (1987), sin embargo, se

hubo problemas de interferencia por clorofila, debido a que los extractos eran de color verde intenso y al momento de la reacción se tornaban café oscuro, lo que no permitía leer su absorbancia. Posteriormente se probó el método de Folin-ciocalteau (descrito en la sección VI.6). Las concentraciones obtenidas fueron muy altas (138 ± 14 mg/g de hoja seca), lo que inicialmente hace pensar que las células rojas que se observan al microscopio almacenan taninos. Sin embargo en una prueba posterior se evaluó la técnica de Folin, utilizando como estándar una muestra de indicán, y se encontró que el método también da positivo en este tipo de compuesto, por lo que hasta el momento no se ha podido definir la naturaleza de los compuestos que dan la tonalidad roja a las células.

En las Figuras III.7A, III.7B, III.7C, y III.7D se presentan cortes de hojas de añil tratados con amoníaco e incluidos en PEG, a los cuales previamente se les dio un tratamiento con soluciones de alcohol en las que se incremento la concentración en 20% cada 5 horas hasta alcanzar el 100%, con la finalidad de eliminar la clorofila y evitar la plasmolisis celular. En estos cortes se aprecia con mayor claridad la estructura de los tejidos y las células de almacenamiento de la hoja.

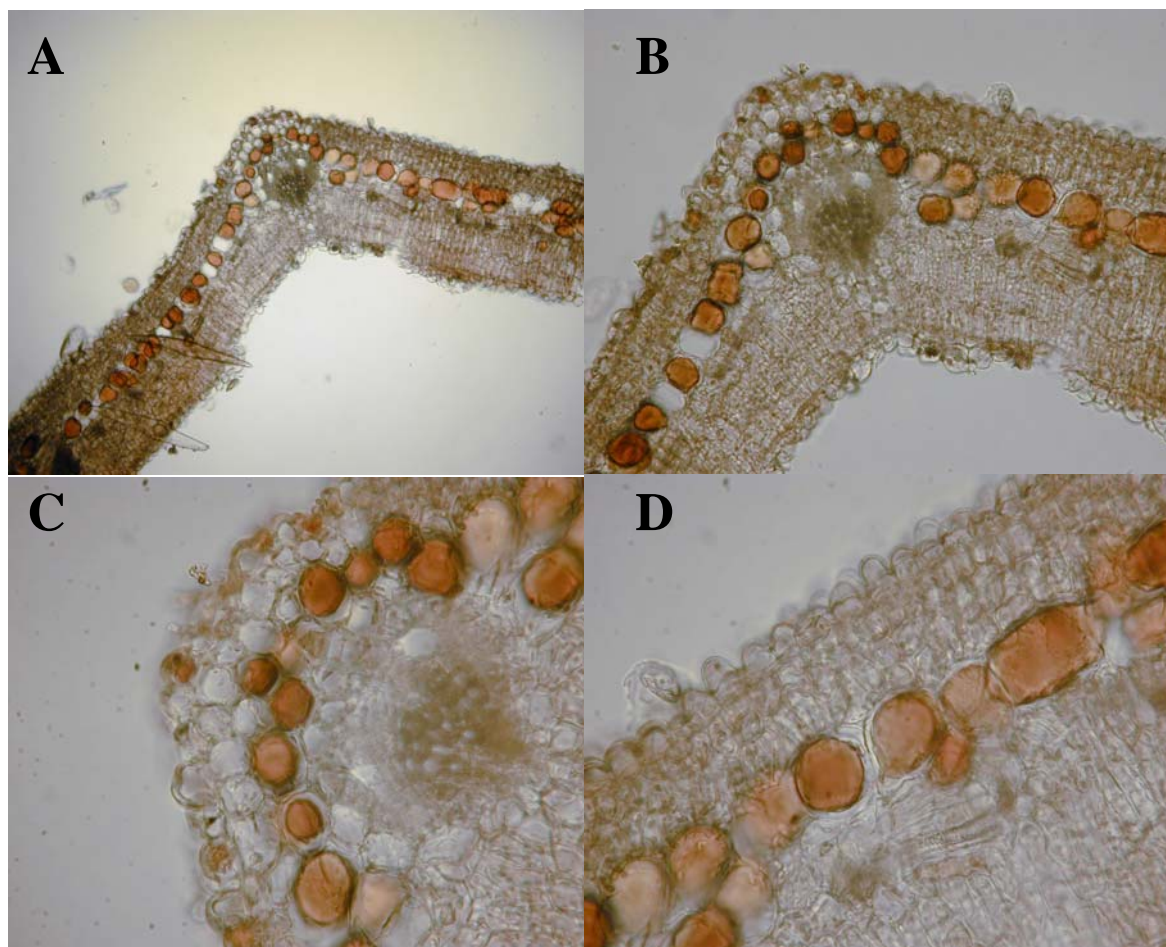


Figura III.7. Cortes transversales de hojas de añil, tratados con amoniaco y etanol e incluidos en PEG. (A)Vista general del corte, ampliación lente 10X. (B) Sección de nervadura, ampliación lente 20X. (C) y (D) Nervadura y sección de hoja, ampliación lente 40 X

III.3. Conclusiones

- Los cortes transversales de las hojas de añil mostraron que esta especie presenta una estructura típica de las plantas dicotiledóneas, constituida por epidermis de haz y envés, mesófilo en el que se detectó parenquima esponjoso y en empalizada y nervaduras con la presencia de haces vasculares (xilema y floema).
- En la región del mesófilo, entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso se observó una capa de células, con grandes vacuolas que almacenan un compuesto de color rojo.
- La inclusión en PEG de las hojas y el tratamiento con amoníaco mostraron que la coloración roja de las células vacuoladas no se debe a la tinción artificial de los tejidos.
- Las pruebas de hidrólisis de indicán confirmaron que se requiere la acción de una enzima β -glucosidasa para que se lleve a cabo la hidrólisis de este compuesto en las hojas de añil.
- Ninguna de las dos técnicas utilizadas para la cuantificación de taninos en hoja de añil pudieron utilizarse para la cuantificación de estos compuestos debido a que la primera (método de la vainillina) presenta interferencia por clorofila y la segunda por indicán.

CAPITULO IV

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCION SOBRE LOS RENDIMIENTOS DE COLORANTES

Indice de contenido

SECCION IVA. Extracción sólido-liquido

IVA.1. Pretratamiento de las muestras

IVA.1.1. Extracción alcalina y secado del añil

IVA.1.2. Tamizado

IVA.2. Parámetros de extracción

IVA.2.1. Relación materia prima-solvente

IVA.2.2. Efecto del tiempo de extracción

IVA.2.3. Efecto de la temperatura

IVA.2.4. Evaluación del efecto del pH del solvente

IVA.3. Evaluación de las condiciones de aireación

IVA.3.1. Efecto del tiempo

IVA.3.2. Efecto del pH

IVA.3. Conclusiones

IVA.4. Bibliografía

Seccion IVB. Extracción asistida por ultrasonido

IVB.1. Extracción a nivel laboratorio

IVB.1.1. Evaluación de la temperatura y del pH

IVB.1.2. Extracción de CAP

IVB.1.3. Extracción de índigo

IVB.1.4. Extracción de indirrubina

IVB.2. Extracción en equipo de 30 L

IVB.2.1. Extracción sin control de pH

IVB.2.2. Extracción a pH controlado

IBV.3. Conclusiones

IVB.4. Bibliografía

CAPITULO IVA

EXTRACCION SÓLIDO LÍQUIDO

Bajo condiciones normales, el proceso de extracción se enfoca a la remoción o separación física de un componente de un sistema por contacto con otro material o fase que tiene una afinidad mayor por el, de tal forma que el éxito de este procedimiento depende de la diferencia de afinidad de un componente o material sobre otro (Kirk-Othmer *et al*, 1993).

Sin embargo, la extracción del índigo involucra más que un mero proceso físico, debido a que este componente proviene de un precursor que se acumula en las plantas y su transformación bioquímica depende de las condiciones de manejo post-cosecha y de la extracción.

En diferentes trabajos de investigación, se ha abordado el efecto de estas condiciones de extracción sobre el rendimiento de los colorantes en las especies *Isatis tinctoria* y *Polygonum tinctorium* (Stoker *et al*, 1998; Bechtold *et al*, 2002; Matadamas-Ortiz, 2002), así como la caracterización de las principales enzimas involucradas (Minami *et al*, 1996; 1997; 2000). En el caso del añil, aunque existen algunos reportes (Wu *et al*, 1999; Chanayath *et al*, 2002), la mayor parte de información proviene del intercambio sobre la experiencia de los productores en el procesamiento del colorante.

En esta primera sección del capítulo IV se abordan los resultados de la evaluación de la influencia de diferentes parámetros de extracción de añil sobre los rendimientos de CAP y su composición principalmente en cuanto al contenido de índigo. Se consideran básicamente tres etapas del procesamiento que son: el pre-tratamiento de la muestra, la extracción y la aireación.

IVA.1. Pretratamiento de las muestras

IVA.1.1. Secado del añil y extracción alcalina

En experimentos preliminares se presentaron dificultades para el transporte al laboratorio y el almacenamiento de las plantas de añil en fresco, debido a que a temperatura ambiente las hojas se tornaron de color azul intenso después de algunas horas, este proceso se aceleró cuando la temperatura y la humedad del ambiente se incrementaron. El oscurecimiento de las hojas también se observó en el material almacenado en refrigeración después de algunos días (Figura IV.1; Arias-Castro y Sandoval-Salas, 1999).

Este comportamiento parece ser el resultado de la hidrólisis enzimática del indicán dentro de las hojas y la formación de índigo, el cual además reacciona con algunos compuestos intracelulares o se fija a algún tejido, debido a que posteriormente se intentó extraerlo de las hojas con el método general de extracción (EC-1, Capítulo V) sin obtener ningún resultado.



Figura IV.1. Oscurecimiento de hojas de añil durante el transporte y almacenamiento

En un experimento posterior se utilizó una solución tampón altamente alcalina ($\text{pH} = 13$) y la extracción se realizó aplicando ultrasonido en un equipo de 20 L, durante 60 minutos sin lograr extraer el colorante.

La tendencia al oscurecimiento del añil se puede considerar como un factor limitante en el procesamiento comercial debido a que impide que la etapa de extracción se realice en un lugar y un tiempo diferente al sitio de cultivo.

Como alternativa, se determinó el efecto de diferentes tratamientos de secado de las hojas sobre los rendimientos finales de extracción. Se utilizó un arreglo estadístico unifactorial en el que los cuatro niveles evaluados fueron:

1. Material fresco.
2. Secado al sol (en charolas de aluminio, durante dos días, el almacenamiento durante la noche a se realizó a temperatura ambiente).
3. Secado en estufa a 100°C , 1 hora.
4. Secado en estufa a 60°C , 16 h.

El experimento se realizó por triplicado.

Después del pre-tratamiento las doce muestras se extrajeron por el método EC-1, y se cuantificaron los rendimientos de CAP (método CC-1, Capítulo V) y de índigo por el método espectrofotométrico (CI-2, Capítulo VI). El experimento se realizó en matraces de 2L.

Las hojas de añil utilizadas en este experimento se cosecharon durante el mes de septiembre de 2004 en la parcela de cultivo ubicada en el estado de Veracruz. Para evitar el oscurecimiento de las muestras el pre-tratamiento y la extracción del CAP se realizó inmediatamente después de la cosecha y el transporte a un laboratorio ubicado a 5 kilómetros del sitio de cultivo.

Los resultados mostraron que el secado en estufa no es apropiado para las hojas de añil, al final del tratamiento a 60° C las hojas presentaron oscurecimiento similar al que se presenta durante el transporte y almacenamiento en fresco, es probable que a esta temperatura no se inactive la enzima β -glucosidasa la cual se ha reportado que es la responsable de la hidrólisis del indicán (Xia y Zenk, 1992) y que la formación y fijación del índigo se lleve a cabo al principio del secado cuando todavía hay suficiente humedad en las células. En este tratamiento no se obtuvo ninguna cantidad de CAP después de la extracción.

Cuando las hojas se secaron a 100° C, mostraron una coloración café claro, los extractos obtenidos de este material fueron de color café oscuro y no se obtuvo ningún precipitado después de la aireación. En este caso, las altas temperaturas pudieron haber favorecido la degradación de los precursores o bien contribuido a la inactivación de la enzima β -glucosidasa.

Hay reportes que mencionan que el proceso de secado puede inactivar las enzimas involucradas en la hidrólisis del indicán. Chanayath *et al*, (2002) encontraron que los rendimientos de colorante e índigo extraídos de la especie *Baphicacanthus cusia* disminuyeron significativamente cuando las plantas se sometieron a un pretratamiento de secado y semi-secado. Por su parte, los trabajos de Minami *et al*, 1996 revelaron que la actividad de la enzima β -glucosidasa en *Polygonum tinctorium* fue mayor en hojas frescas respecto a la obtenida en hojas secas. Resultados similares se obtuvieron durante el secado de hojas de pastel (Matadamas-Ortiz, 2002).

En los dos tratamientos restantes (secado al sol y extracción en fresco) si se pudo recuperar CAP después de la extracción, los rendimientos obtenidos se presentan en la Figura IV.2.

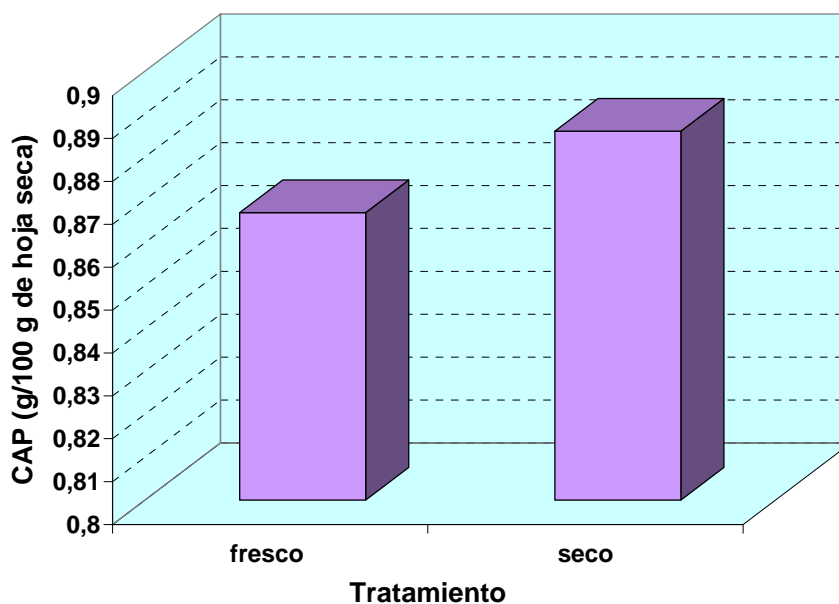


Figura IV.2. Extracción de CAP en muestras de hojas de añil frescas y secadas al sol

Aunque aparentemente se obtuvieron mejores rendimientos de CAP en extractos provenientes de hojas secas, el análisis estadístico (ANOVA y comparación de medias; JMP[®], 1999) mostró que no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos (Figura IV.3), lo que haría pensar que pueden utilizarse hojas frescas o secas de manera indistinta.

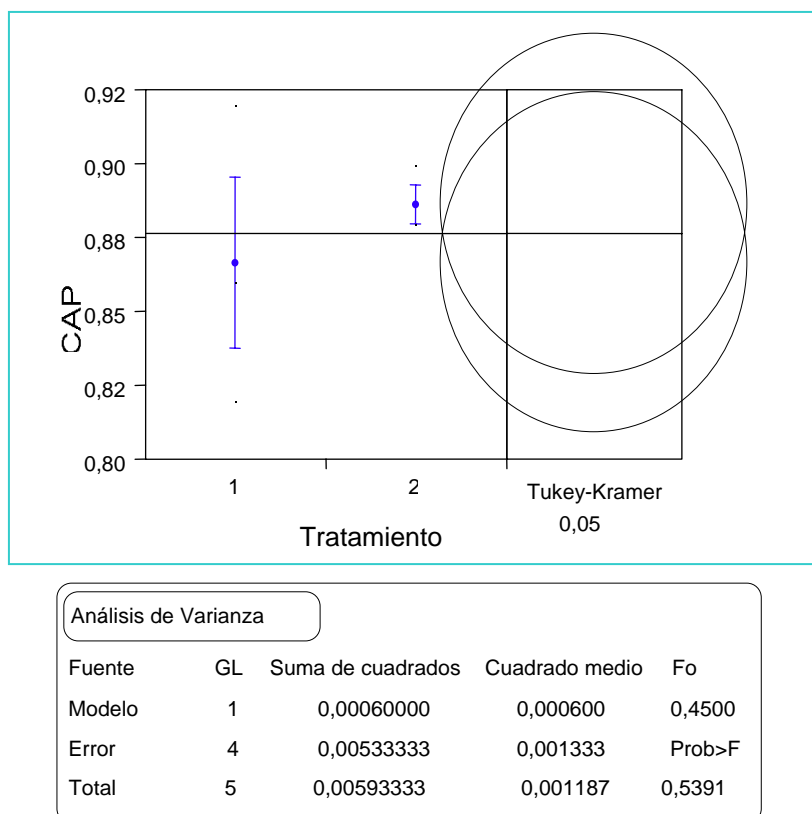


Figura IV.3. Resultados del análisis estadístico de CAP obtenido durante el experimento de secado. (1) Muestras frescas; (2) Muestras secas

Sin embargo, el análisis de la concentración de índigo mostró resultados diferentes (Figura IV.4). Aparentemente, el tratamiento de secado de las hojas de añil afectó en mayor proporción la composición del CAP (concentración de índigo) que la cantidad extraída. El análisis de varianza de las muestras (Figura IV.5; JMP®, 1999), confirmó estos resultados, debido a que se encontró que sí existe diferencia significativa entre los dos tratamientos. La concentración final de índigo en el CAP fue 34% más alta en las muestras obtenidas por extracción de las hojas secas respecto a las obtenidas de extracciones de hojas frescas, este resultado se opone a lo reportado con anterioridad en la mayoría de las especies productoras de índigo (Minami *et al*, 1996; Chanayath *et al*, 2002; Matadamas-Ortiz, 2002).

Durante la experimentación se observó que las extracciones a partir de hoja seca se llevaban a cabo en tiempo menor respecto a aquellas en las que se utilizaba hojas frescas, es posible que la operación de secado provoque modificaciones en la estructura de las hojas favoreciendo la transferencia de masa (liberación del precursor al medio).

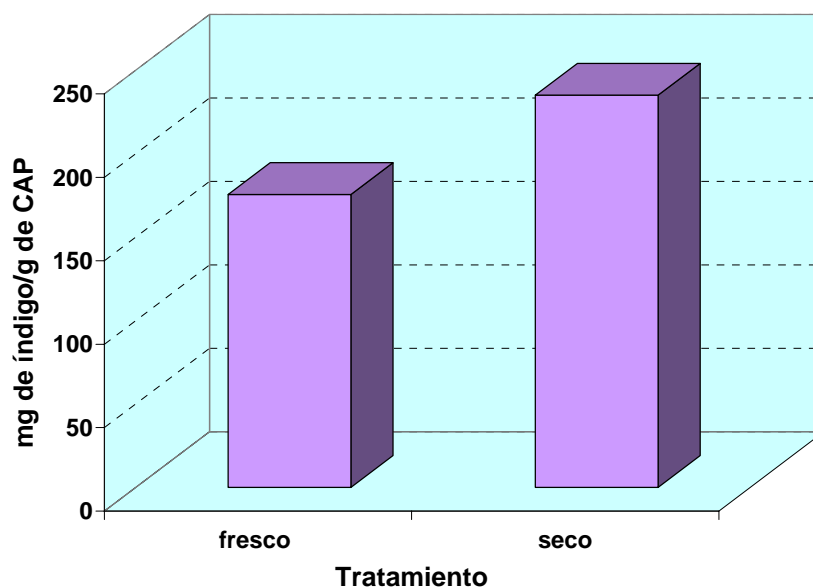
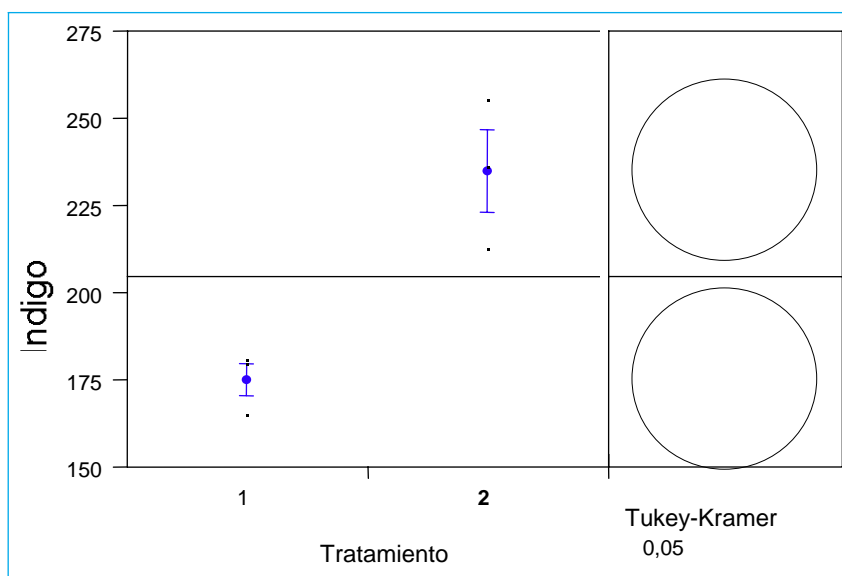


Figura IV.4. Concentración de índigo en el CAP obtenido por extracción de (1) hojas frescas y (2) hojas secas



Análisis de varianza				
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	1	5304,9409	5304,94	19,5409
Error	4	1085,9167	271,48	Prob>F
C Total	5	6390,8576	1278,17	0,0115

Figura IV.5. Análisis estadístico de la concentración de índigo en el CAP obtenida durante el experimento de secado. (1) Muestras frescas; (2) Muestras secas

IVA.1.2. Tamizado

En la epidermis de las plantas es frecuente la presencia de pelos o tricomas que son apéndices de la misma compuestos de una o varias células (Von Denfer *et al*, 1993). Las hojas de añil presentan sobre su superficie una gran cantidad de estas estructuras (Figura IV.6), las cuales después del secado adquieren la apariencia de polvo blanco urticante, mismo que se desprende con facilidad. Durante la extracción del CAP se observó que este polvo se mezcla con los extractos incrementando el rendimiento aparente del CAP.

Con la finalidad de corregir este efecto se realizó la separación física de los tricomas mediante tamizado de las muestras y se evaluó su influencia sobre los rendimientos de CAP y de índigo.



Figura IV.6. Micrografía de la superficie de la hoja de añil en la que se observa la apariencia de los tricomas

Este experimento se realizó en el Laboratorio de Química Agroindustrial de la ENSIACET, INP en Toulouse, Francia (LCA-ENSIACET).

Se utilizó un arreglo unifactorial con los siguientes niveles:

- a) Muestras de hojas tamizadas que no pasaron la malla de 0.25 mm.
- b) Muestras sin tamizar.
- c) Fracción tamizada conteniendo los tricomas.

El experimento se realizó por triplicado.

Después del pre-tratamiento las muestras se extrajeron por el procedimiento EC-2, utilizando un reactor de vidrio de 2 L, con temperatura controlada (28° C). El índigo se analizó por HPTLC-densitometría (Método CI-1, Capítulo V). Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos en esta sección experimental se presentan en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Efecto del tamizado sobre el rendimiento de CAP e índigo extraídos de hojas de añil

Tratamiento	Color del extracto	CAP (g/100 g de hoja seca)	Concentración de índigo (mg/ g de CAP)	Índigo (g/100 de hoja seca)
Hojas sin tamizar	Azul marino brillante.	0.1856	388.00	0.0720
Hojas tamizadas	Azul marino brillante.	0.1559	446.07	0.0695
Fracción con tricomas	Café claro.	0.0605	0.00	0.00

La concentración de CAP en las hojas fue ligeramente mayor en las muestras tamizadas. Sin embargo, el efecto no fue estadísticamente significativo (Figura IV.7; ANOVA y comparación de medias JMP®, 1999). De la fracción con tamaño de partícula menor a 0.25 mm se obtuvo un extracto de color café claro en el que no se detectó la presencia de índigo.

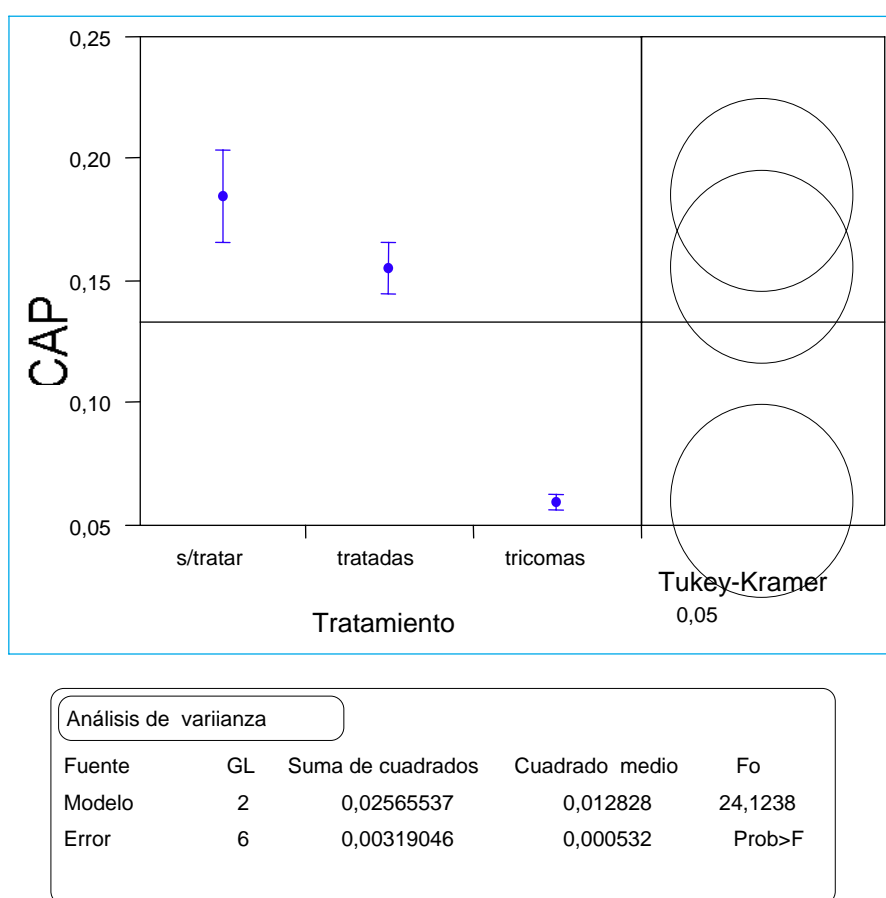


Figura IV.7. Comparación estadística de la concentración de CAP en hojas de añil tamizadas y sin tamizar

La principal diferencia entre los tratamientos se observó en la concentración de índigo en el CAP, las muestras tamizadas presentaron valores significativamente más altos que los obtenidos en las muestras sin tamizar (Figura IV.8; ANOVA y comparación de medias JMP®, 1999).

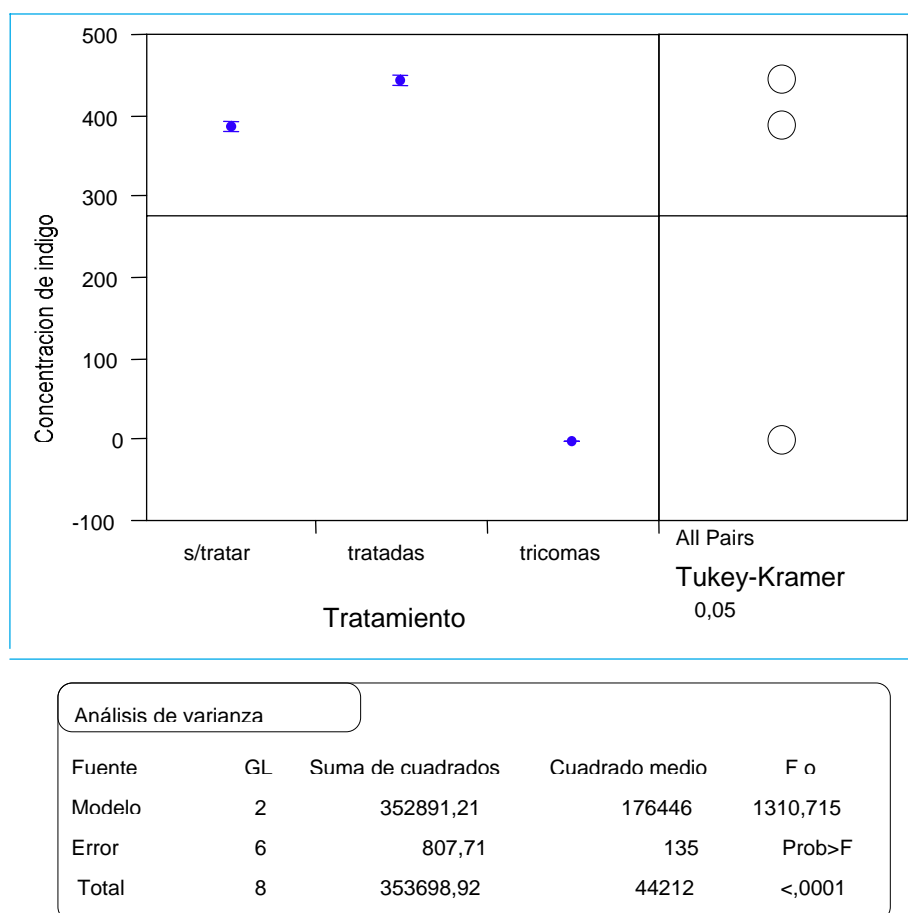


Figura IV.8. Comparación estadística de la concentración de índigo en el CAP extraído de muestras tamizadas y sin tamizar

Por otra parte, la concentración de índigo en las hojas fue similar en ambos tratamientos lo que demuestra que la presencia de tricomas en la materia seca para la extracción de añil resulta en la obtención de extractos coloridos con mayores impurezas y menor contenido de índigo (Figura IV.9; ANOVA y comparación de medias, JMP[®], 1999). Por lo anterior, se recomienda tamizar el material deshidrato antes de realizar la extracción de colorantes de añil.

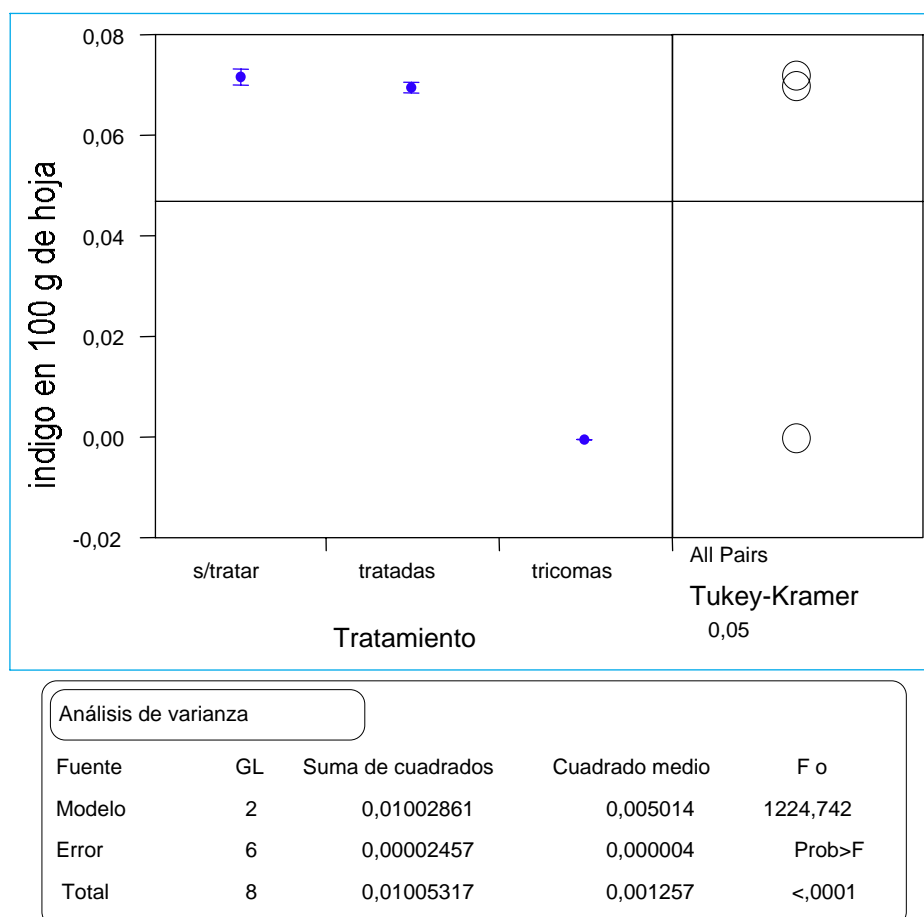


Figura IV.9. Comparación estadística de la concentración de índigo en muestras de hojas deshidratadas de añil tamizadas y sin tamizar

IVA.2. Parámetros de extracción

IVA.2.1. Relación materia prima-solvente

El efecto de la proporción de hoja seca respecto a la cantidad de solvente empleada en la extracción se determinó de acuerdo al arreglo estadístico unifactorial de 4 niveles, en el que se consideraron tres repeticiones. Las relaciones materia prima/solvente (MP/S) que se evaluaron fueron las siguientes:

1. 1/20.
2. 1/10.
3. 1/6.7.
4. 1/4.

La variable de respuesta del efecto de los tratamientos fue la cantidad de CAP extraída en cada uno de los tratamientos. Los resultados obtenidos en esta sección mostraron que no existe diferencia significativa en la cantidad de colorante extraída cuando se manejan relaciones de MP/S desde 1: 6.7 hasta 1:20 (Figuras IV.10 y IV.11). Con base a estos resultados en la mayoría de los experimentos subsecuentes se utilizó la relación MP/S de 1:10. La eficiencia de extracción disminuyó notablemente cuando se utilizó la relación MP/S de 1:4, en este tratamiento también se presentaron problemas en el manejo de las muestras debido a que se dificultaba su humedecimiento.

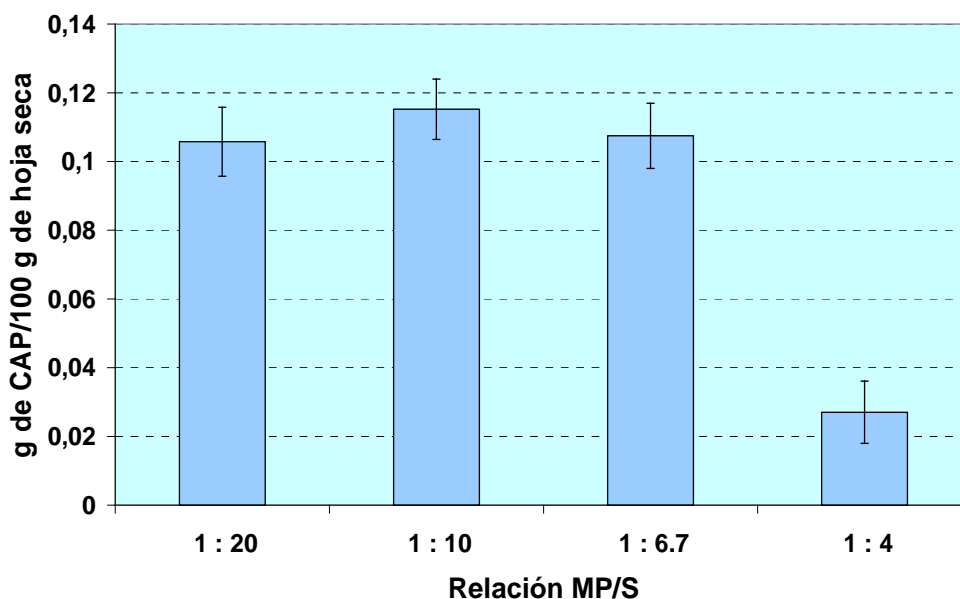


Figura IV.10. Efecto de la relación MP/S utilizada en la extracción de CAP a partir de hojas de añil

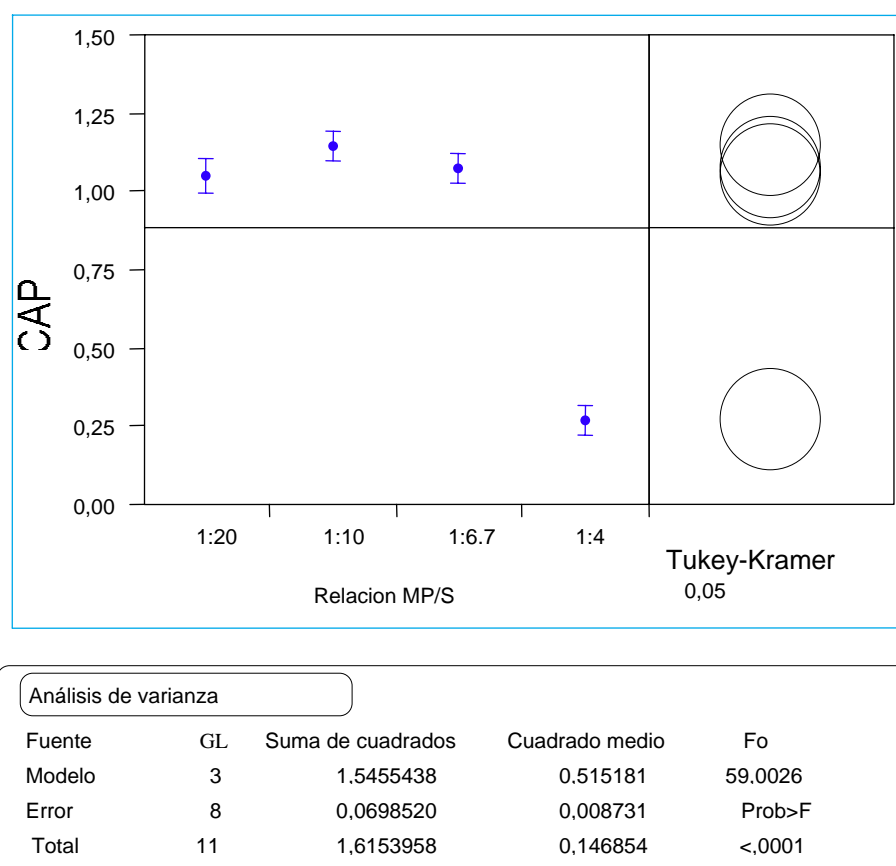


Figura IV.11. Análisis de varianza y comparación de medias de los tratamientos de extracción a diferentes relaciones MP/S

IVA.2.2. Efecto del tiempo de extracción

Como ya se había comentado anteriormente, el tiempo de extracción de colorantes del añil varia cuando se utiliza materia prima seca. En esta sección se hicieron una serie de pruebas con la finalidad de determinar los tiempos de proceso a utilizar en los experimentos subsecuentes.

En las primeras pruebas, las cuales se realizaron en un reactor de vidrio de 8 L de capacidad (Relación MP/S=1:10) se determinó el efecto del tiempo sobre la extracción de CAP (Figura IV.12).

Se utilizó un arreglo estadístico unifactorial con seis niveles de tiempo de extracción, los cuales fueron 2, 4, 6, 8, 24, y 28 horas. Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado para obtener un total de 18 corridas de extracción.



Figura IV.12. Reactores de vidrio de 8 litros utilizados en la extracción de añil

Los resultados de rendimiento de CAP obtenidos en cada uno de los tratamientos se presentan en la Figura IV.13.

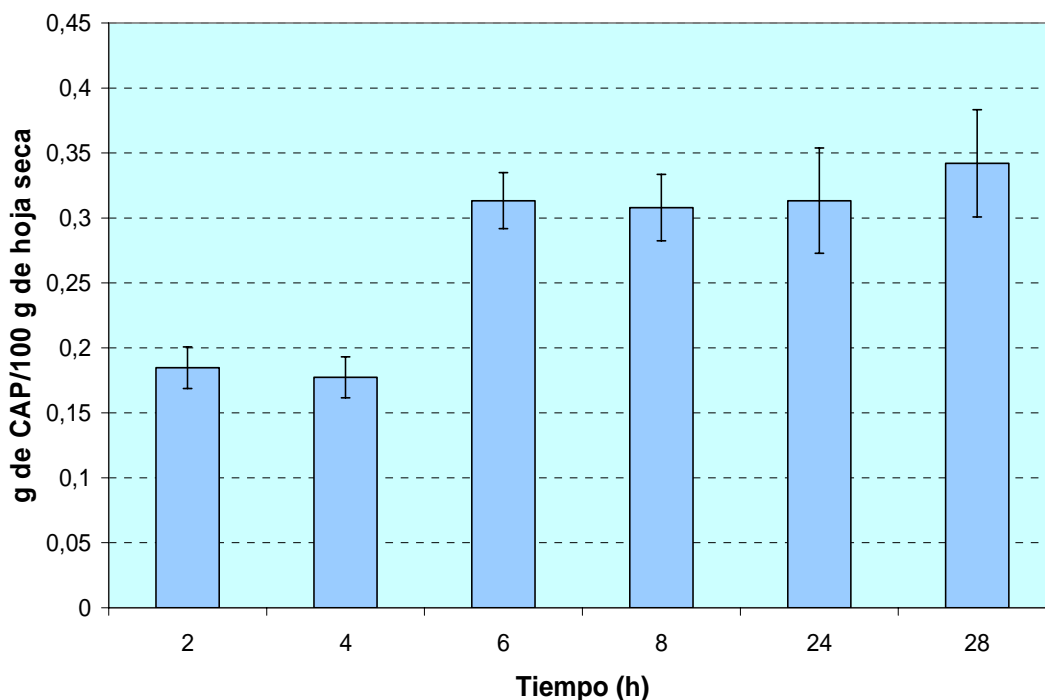


Figura IV.13. Resultados del rendimiento de CAP a diferentes tiempos de extracción

El 50% del CAP extraíble se obtuvo desde las primeras dos horas, esta concentración se mantuvo hasta las 4 horas y posteriormente se incremento a las seis horas de extracción. El análisis estadístico de los datos mostró que después de este periodo no existe diferencia significativa en la cantidad de CAP extraído, por lo que se considera innecesario continuar la extracción después de las seis horas (Figura IV.14; ANOVA y comparación de medias, JMP[®], 1999).

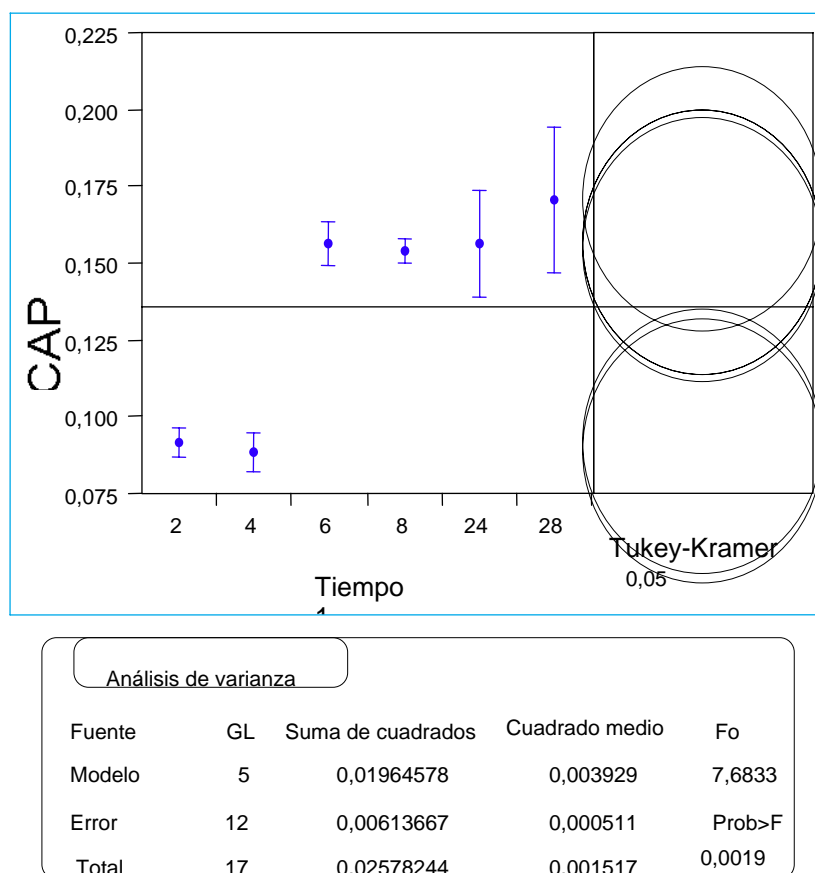


Figura IV.14. Análisis de varianza y comparación de medias del rendimiento de CAP a diferentes tiempos de extracción

En cuanto a la concentración de índigo en el CAP se obtuvieron valores relativamente constantes en todos los tratamientos (15-18%).

El tiempo de extracción obtenido en esta etapa experimental es menor que los tiempos reportados para la extracción de materia fresca por el método tradicional (10-30 horas; Marzocca, 1993; Matadamaz-Ortiz, 2002; Barrera y Ramírez, 2003) y a nivel laboratorio (10-24 h; Wu *et al*, 1999; Chanayath *et al*, 2002). Estos valores son importantes considerando que una reducción en le tiempo de proceso permite realizar un mayor número de corridas de extracción en el mismo recipiente con la consecuente disminución en el tamaño de las instalaciones y en los costos.

IVA.2.3. Efecto de la temperatura

Para la evaluación del efecto de la temperatura sobre la extracción se consideraron los siguientes niveles de temperatura y tiempo:

- a) 25° C (30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360 minutos).
- b) 35° C (30, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240, 300 minutos).
- c) 45° C (15, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 150, 180 minutos).
- d) 60° C (15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos).

Los tiempos de extracción se establecieron de acuerdo a los resultados de un experimento preliminar en el que el rendimiento del colorante se monitoreo por extracción directa con acetato de etilo y medición de la absorbancia a 600 nm.

Para la extracción de las muestras se utilizó el método EC-1 descrito en el capítulo V. El análisis de contenido de índigo se realizó por espectrofotometría de acuerdo al procedimiento CI-2 descrito en el Capítulo V.

Todas las pruebas se hicieron por triplicado y cada una de las unidades experimentales consistió de un matraz Erlenmeyer de 2 litros (99 en total). La temperatura al interior del matraz se controló con ayuda de un baño recirculador.

A 25° C, se observó que la mayor parte de CAP se extrae durante las primeras dos horas aunque posteriormente la cantidad de CAP obtenida se incrementa ligeramente (Figura IV.15). El rendimiento de índigo también se incremento respecto al tiempo, y se mantuvo hasta las cinco horas. El rendimiento máximo de CAP fue 1.8 g/100 g de hoja seca y el de índigo fue 700 mg/100 g hoja seca.

Aunque el comportamiento de la curva de extracción de CAP a 35° fue diferente del obtenido a 25° C, los rendimientos máximos obtenidos fueron muy similares (Figura IV.16). La concentración final de índigo fue ligeramente menor a 35° C. Estos resultados indican que entre 25 y 35° C, no existe diferencia en la actividad de las enzimas participantes en la hidrólisis del indicán.

Los rendimientos finales de CAP y de índigo obtenidos a 45° C (Figura IV.17) fueron menores que los obtenidos a menor temperatura, este efecto fue más notable en los experimentos realizados a 60° C (Figura IV.18), lo que probablemente se deba a una disminución en la actividad de las enzimas. Minami *et al* (1996), reportaron que la actividad de la enzima β -glucosidasa de la especie *Polygonum tinctorium* disminuía hasta en 50% cuando se incubaba a 37° C por más de 20 minutos y desaparecía completamente a 60° C.

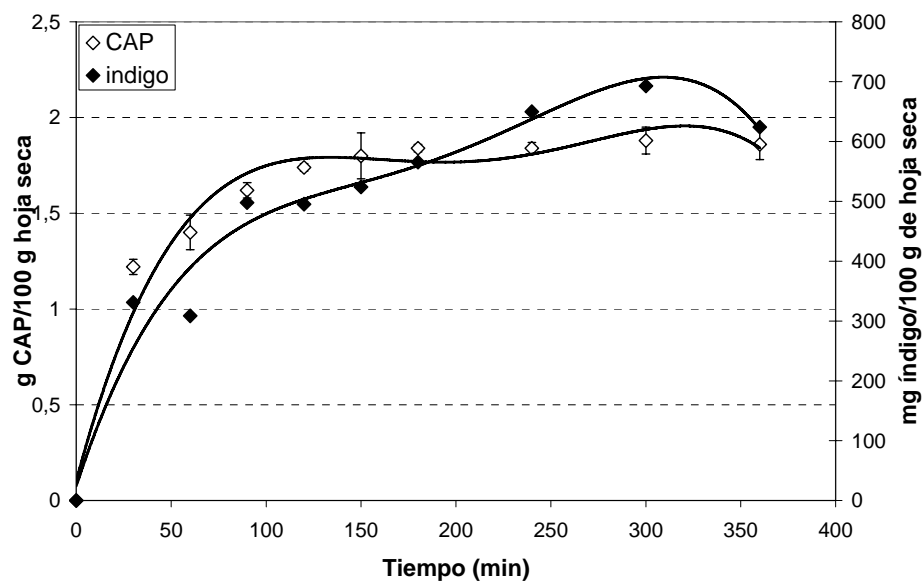


Figura IV.15. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 25 ° C

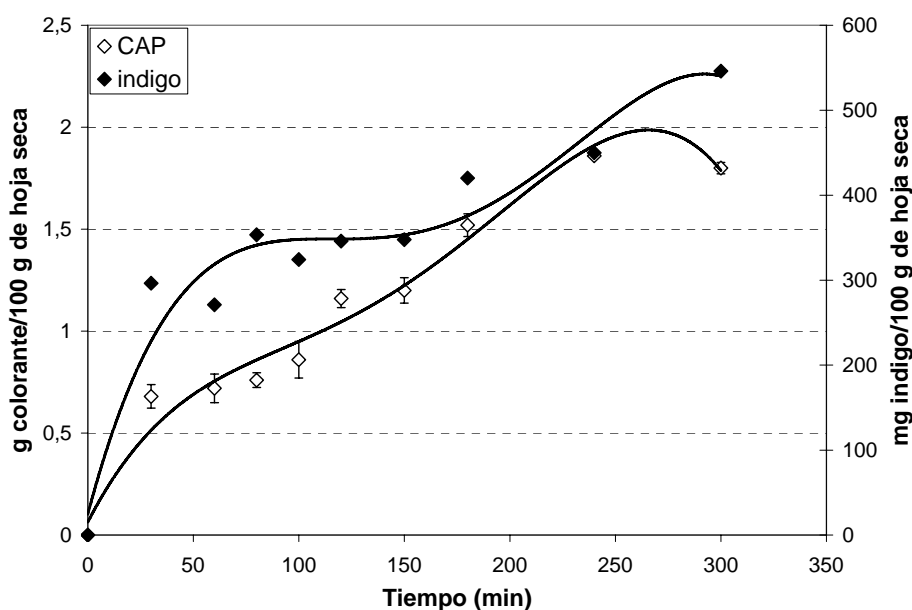


Figura IV.16. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 35° C

La curva de extracción a 45° C mostró que la mayor parte CAP e índigo (80%) se obtuvo durante los primeros quince minutos, se mantuvo hasta los 80 minutos (con un $\alpha = 0.05$, no se encontraron diferencias significativas entre las medias durante este periodo) y posteriormente tuvo un ligero incremento (Figura IV.17). Con anterioridad se ha reportado

la presencia de más de un precursor de índigo en la especie *Isatis tinctoria* (Obertür *et al*, 2004), estos precursores presentan diferencias en cuanto a las condiciones que requieren para su hidrólisis (Kokubun *et al*, 1998), es probable que las plantas de *Indigofera* también contengan más de un precursor y que el comportamiento de la curva de extracción a esta temperatura se deba a que en la primera etapa se hidroliza el precursor indicán, el cual requiere la acción de la enzima β -glucosidasa y posteriormente cuando ya avanza el tiempo de extracción se presente la hidrólisis de otros precursores los cuales podrían hidrolizarse por otra enzima con diferente respuesta a la temperatura, o bien por hidrólisis química.

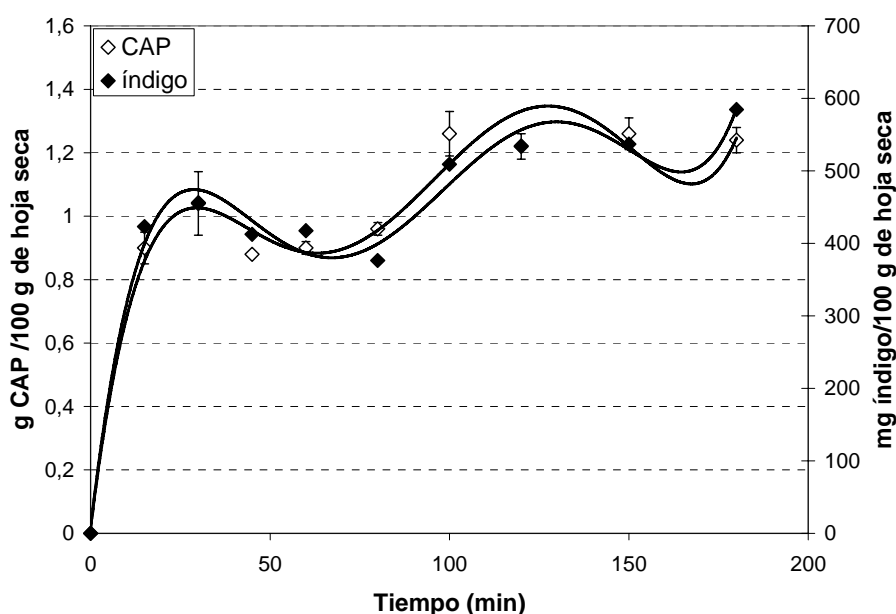


Figura IV.17. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 45° C

La concentración máxima de CAP a temperatura de extracción de 60° C se obtuvo durante los primeros quince minutos posteriormente no se presentó diferencia significativa en los rendimientos ($\alpha = 0.05$). En el caso del índigo se obtuvo mayor rendimiento a los quince minutos y posteriormente se observó una ligera disminución cuando se incrementó el tiempo de extracción (Figura IV.18).

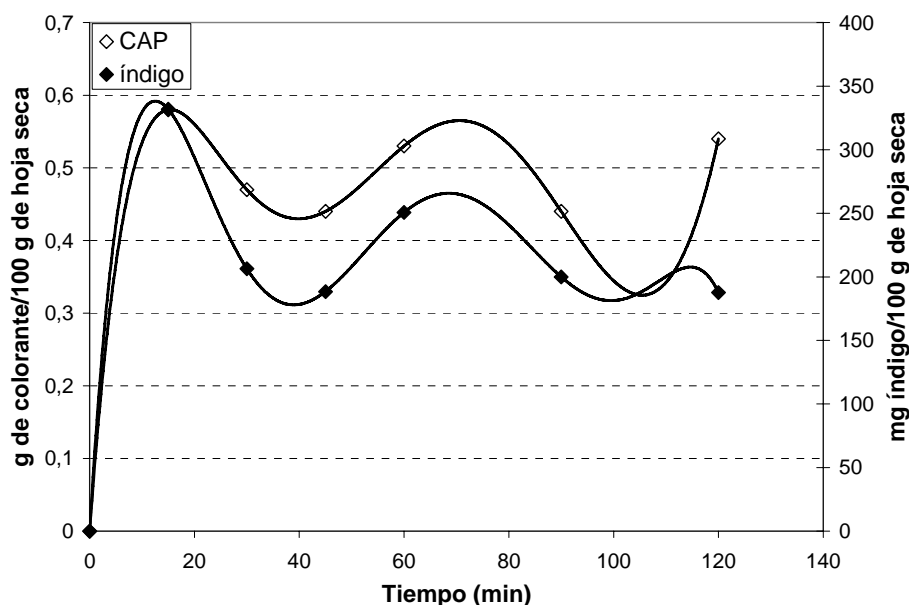


Figura IV.18. Curva de extracción de CAP e índigo de plantas de añil a 60° C

IVA.2.4. Evaluación del efecto del pH del solvente

La evaluación del efecto del pH sobre la extracción se realizó en reactores de vidrio de 8 litros, de acuerdo a un diseño estadístico unifactorial de 5 niveles de pH, los cuales fueron: 2, 5, 7, 9 y 12. Las soluciones tampón a diferentes pH se prepararon de acuerdo al procedimiento ST-1, descrito en el Capítulo V. Asimismo para la extracción y cuantificación de índigo se utilizaron los métodos EC-1 y CI-2 (Capítulo V), respectivamente, la duración de la extracción fue de seis horas. Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado.

Los resultados de los rendimientos de CAP e índigo en cada uno de los tratamientos se presentan en las Figuras IV.19 y IV.20.

El análisis estadístico de los resultados (Figuras IV.21 y IV.22), mostró que existen diferencias significativas entre los rendimientos obtenidos en los tratamientos a pH= 7 y pH=12 y el resto de los tratamientos. El rendimiento de CAP en los dos tratamientos fue muy similar (cercano a 2%). Mientras que el rendimiento de índigo fue superior cuando se utilizó un pH de extracción inicial de 12 (1 %) respecto al obtenido a pH = 7 (0.8 %).

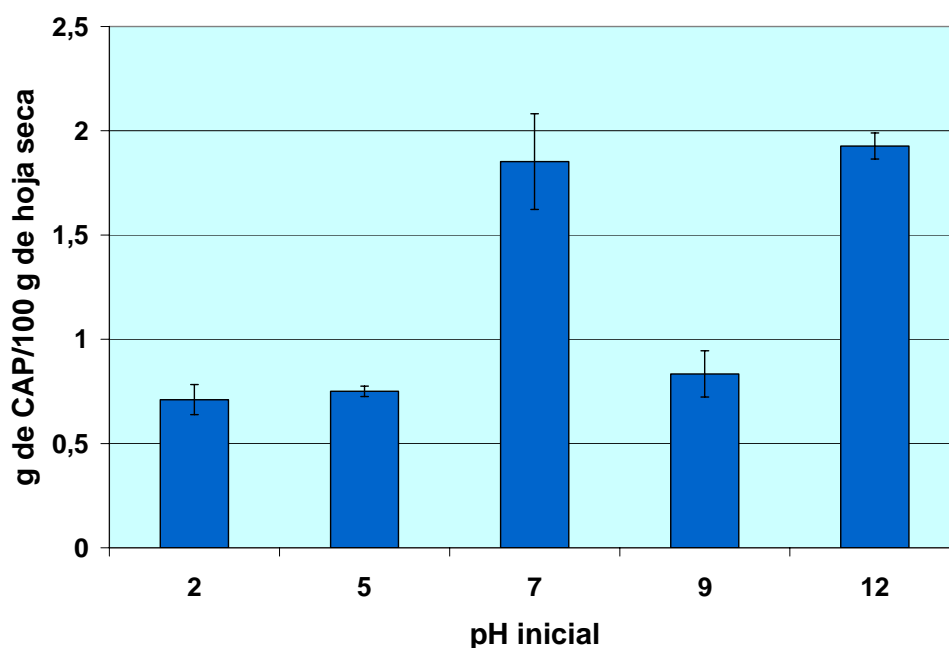


Figura IV.19. Concentración obtenida de CAP a diferentes valores de pH de extracción

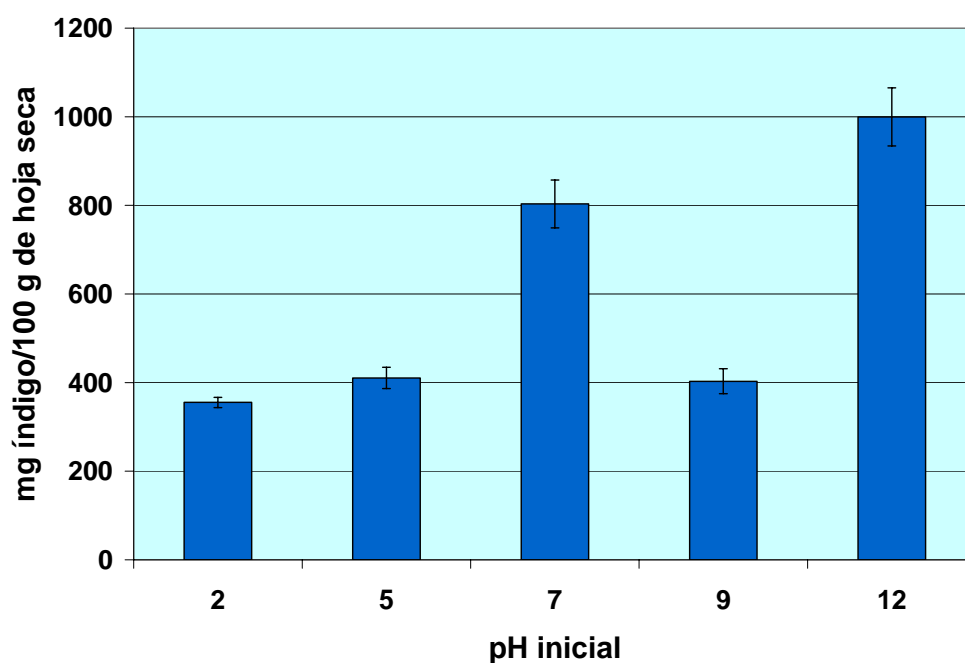


Figura IV.20. Concentración obtenida de índigo a diferentes valores de pH de extracción

En estudios anteriores, se ha mencionado que la unión del indicán es de naturaleza éter y que es muy resistente, por lo que para romperse requiere de la acción de enzimas o la utilización de álcalis fuertes ($\text{pH} = 13.1$) por periodos de tiempo relativamente largos (Kokubun, *et al*, 1998). Probablemente, la diferencia en la cantidad de índigo obtenido a $\text{pH}=12$ sea una respuesta a cierta hidrólisis química de este compuesto, debido al nivel de alcalinidad del medio.

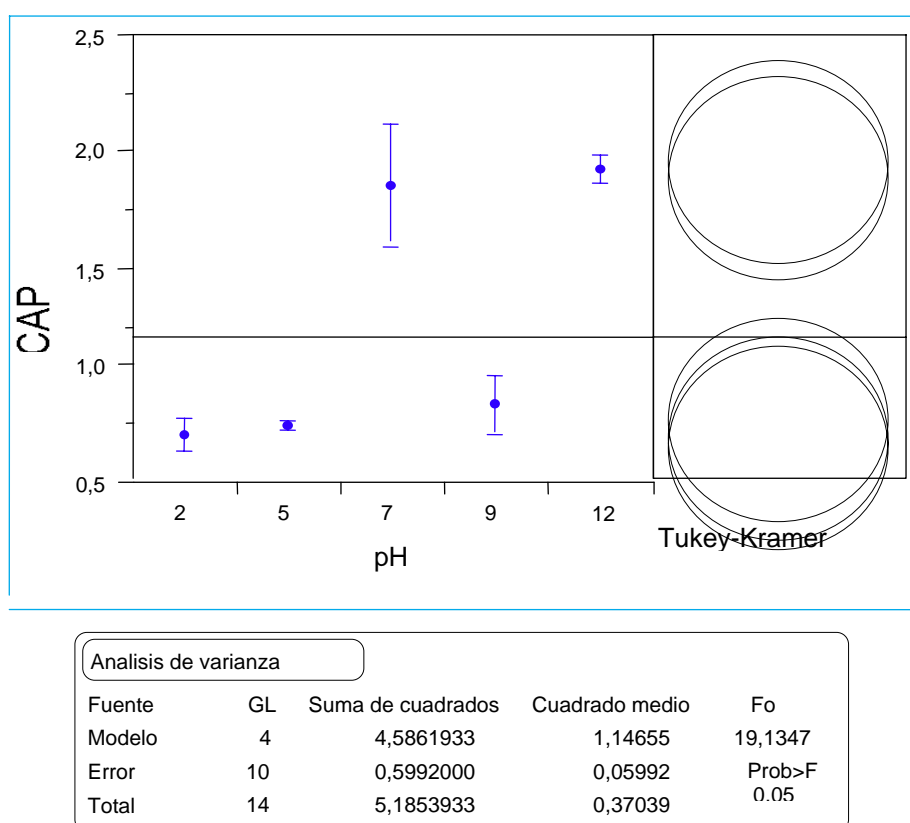


Figura IV.21. Análisis de varianza del rendimiento de CAP a diferentes pH

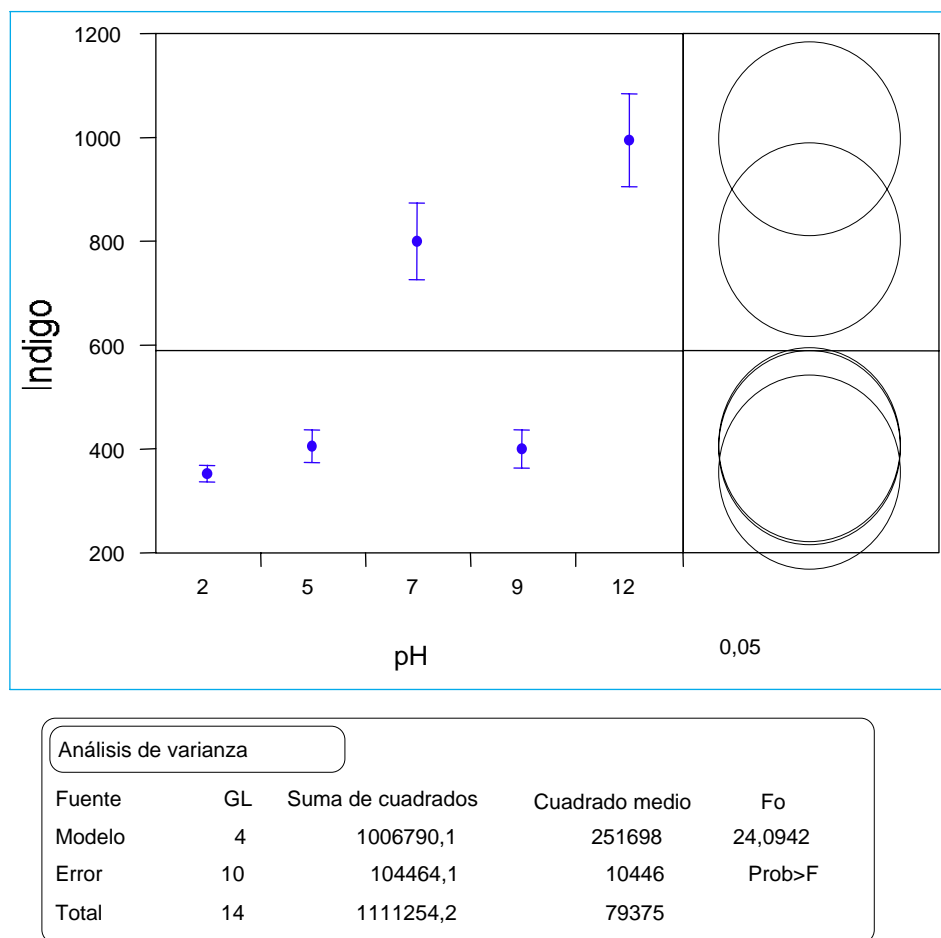


Figura IV.22. Análisis de varianza del rendimiento de índigo a diferentes pH

Por otra parte, en todos los tratamientos se observó que el pH de la solución al final de la extracción evoluciona hacia niveles cercanos a la neutralidad (Figura IV.23), siendo más marcado a valores de pH extremos (2 y 12). Este efecto puede deberse a que durante la extracción conjuntamente con los precursores se liberan al medio otro tipo de metabolitos, que actúan como sustancias amortiguadoras del pH facilitando la acción de las enzimas. Este tipo de compuestos podrían existir como tales dentro de la planta o ser un subproducto de las reacciones de hidrólisis de los precursores durante la extracción.

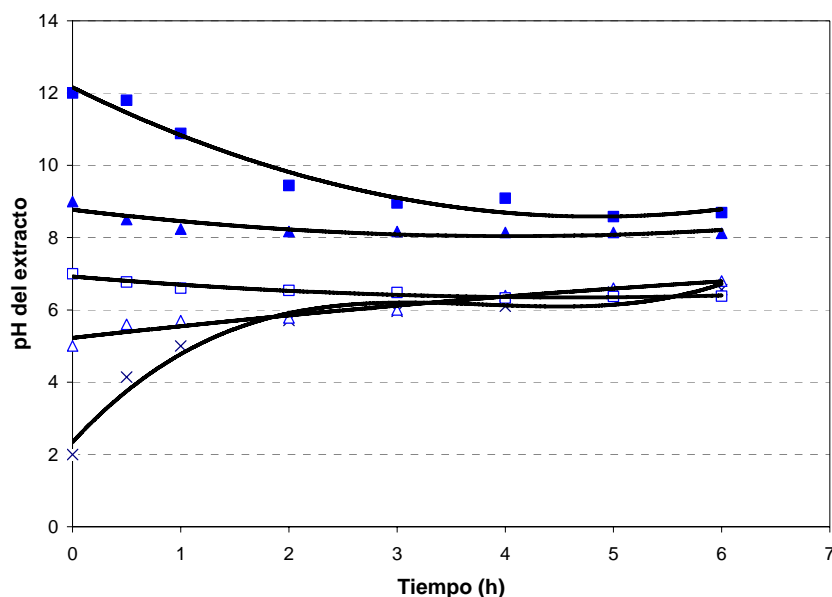


Figura IV.23. Evolución del pH respecto del tiempo durante la extracción de colorantes en plantas de añil

Durante la extracción se monitoreo la absorbancia por espectrofotometría de los extractos conforme los valores de pH evolucionaron. En los tratamientos iniciados a pH =2 y pH = 12 se tomaron muestras de 10 mL y se les determinó el pH, posteriormente se utilizaron 2 mL, se extrajeron directamente con 20 mL de acetato de etilo en un embudo de separación, al extracto se le determinó su absorbancia a 600 nm (Figura IV.24a y IV.24b).

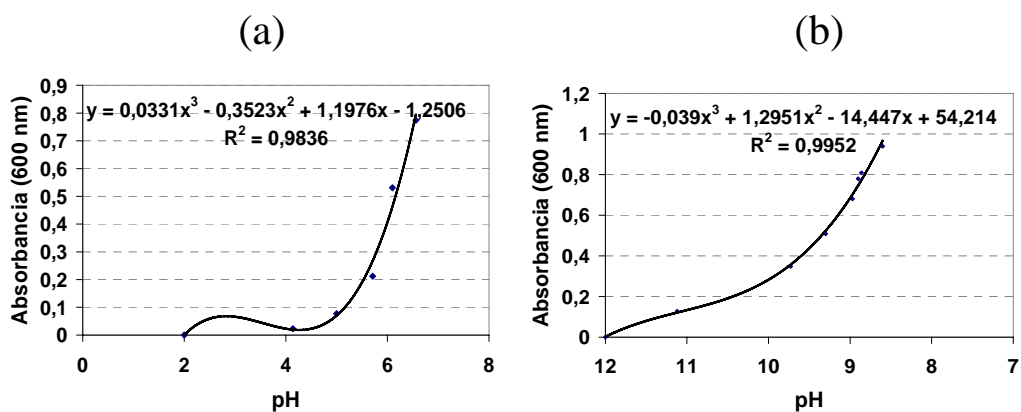


Figura IV.24. Cambios en el contenido de índigo (medido como absorbancia) en los extractos de añil a medida que evoluciona el pH del medio: (a) pH inicial = 2; (b) pH inicial = 12

Los resultados mostraron que la cantidad de colorante extraído incrementa a medida que el pH se acerca a valores neutrales. En los dos tratamientos se encontró que estos parámetros están relacionados entre si por una ecuación de tercer orden.

IVA.3. Evaluación de las condiciones de aireación

Durante la extracción de añil el indican es liberado al medio e hidrolizado por la acción de una enzima β -glucosidasa para formar indoxilo, este compuesto se oxida por aireación para formar el compuesto colorido (índigo; Maugard, 2001). En esta sección se estudio el efecto de las condiciones de aireación de los extractos sobre los rendimientos de colorante.

IVA.3.1. Efecto del tiempo

El efecto del tiempo de aireación sobre el rendimiento de CAP se evaluó a partir de extractos de hoja seca obtenidos por el método EC-1 (Capítulo V). Los extractos se colocaron en matraces de 1 L y se les aplico una corriente de aire de 15 vvm durante 10, 20 y 30 minutos. Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura IV.25.

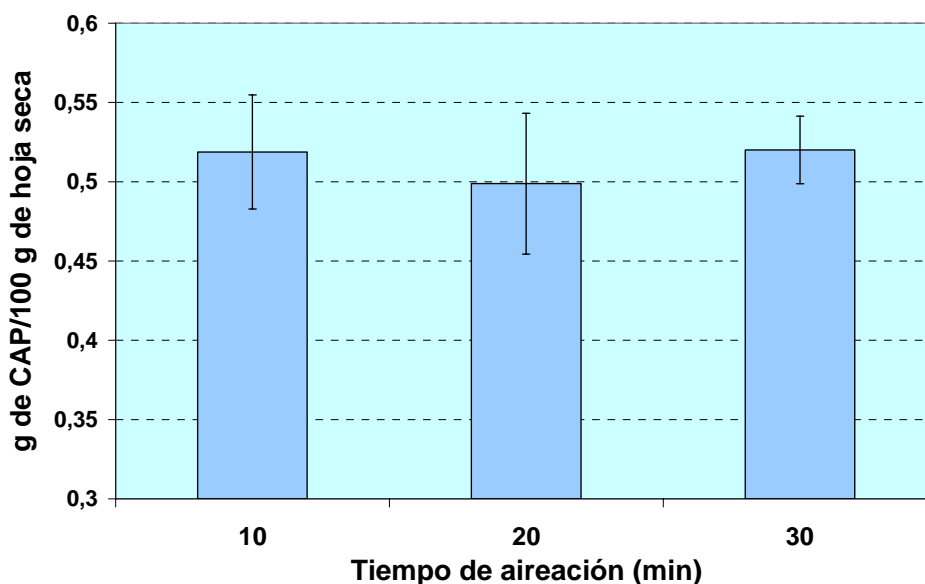


Figura IV.25. Efecto del tiempo de aireación sobre el rendimiento de CAP

Los valores de CAP son similares en los tres tratamientos. El análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa en los rendimientos de CAP en el periodo comprendido entre los 10 y los 30 minutos de aireación (Figura IV.26; ANOVA y comparación de medias, JMP®, 1999).

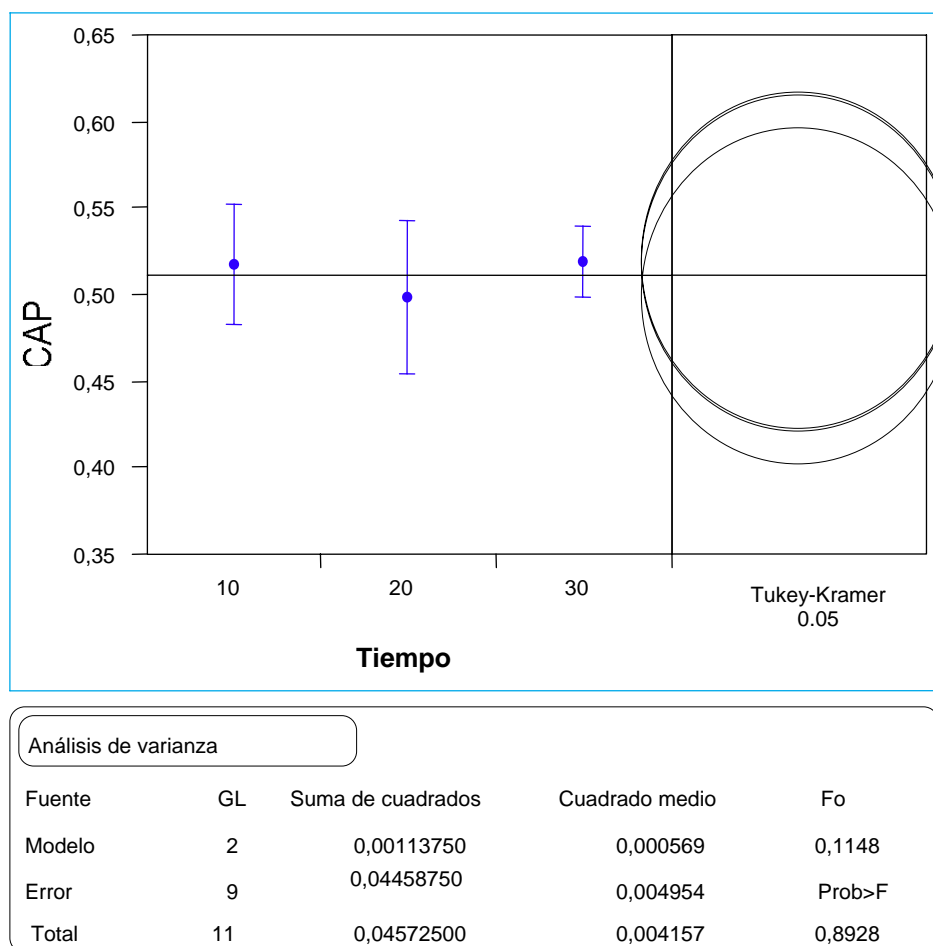


Figura IV.26. Análisis estadístico del efecto del tiempo de aireación sobre el rendimiento de CAP

IVA.3.2. Efecto del pH

Los extractos utilizados en este experimento se obtuvieron de acuerdo al método EC-1 del Capítulo V, utilizando reactores de vidrio de 8 L. Cada unidad experimental consistió de matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 500 mL de extracto. Las muestras se ajustaron a

valores de pH de 3, 4.5, 6, 7, 8, 9.5, 11 y 12 utilizando soluciones 1 N de NaOH y HCl y posteriormente se airearon durante 30 minutos, a 15 vvm. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Los valores de CAP obtenidos se presentan en la Figura IV.27.

No se encontraron diferencias significativas en los rendimientos dentro del rango de pH de 3 a 7 (pH ácido-neutro; $\alpha = 0.05$). Por otra parte, en rango de pH alcalino la cantidad de CAP se incremento conforme se incremento el pH de la solución de extracción.

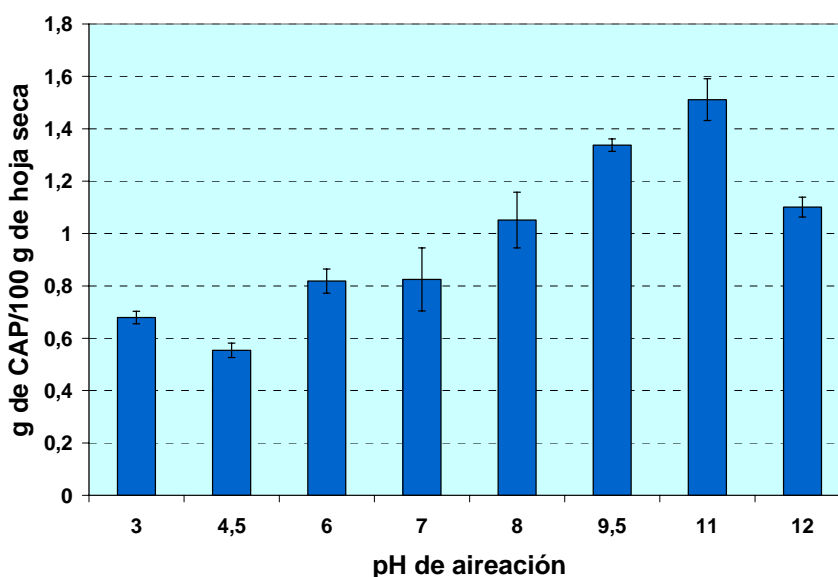


Figura IV.27. Rendimientos de CAP obtenidos a diferentes valores de pH de aireación

Dentro del rango de pH de 3 a 7 tampoco se encontró diferencia significativa en el rendimiento de índigo (Figura IV.28; $\alpha = 0.05$). Sin embargo, dentro del rango de valores de pH alcalino, a diferencia del rendimiento de CAP, la cantidad de índigo disminuye a medida que se incrementa el pH, lo cual significaría que a pesar de que al incrementar el pH se puede obtener mayor cantidad de colorante, este colorante presenta mayores impurezas. La razón por la cual se presenta este comportamiento, podría estar asociada al incremento en la producción de indirrubina. Se sabe que el precursor indoxilo en un medio rico en oxígeno puede oxidarse para formar isatina, la cual se condensa con otro indoxilo dando origen a la indirrubina. Aunque se desconoce a detalle las condiciones que favorecen la formación de isatina, algunos reportes de trabajos realizados con pastel han

demostrado que las condiciones alcalinas durante la extracción dan como resultado incremento en la cantidad de indirrubina obtenida (Matadamas-Ortiz, 2002).

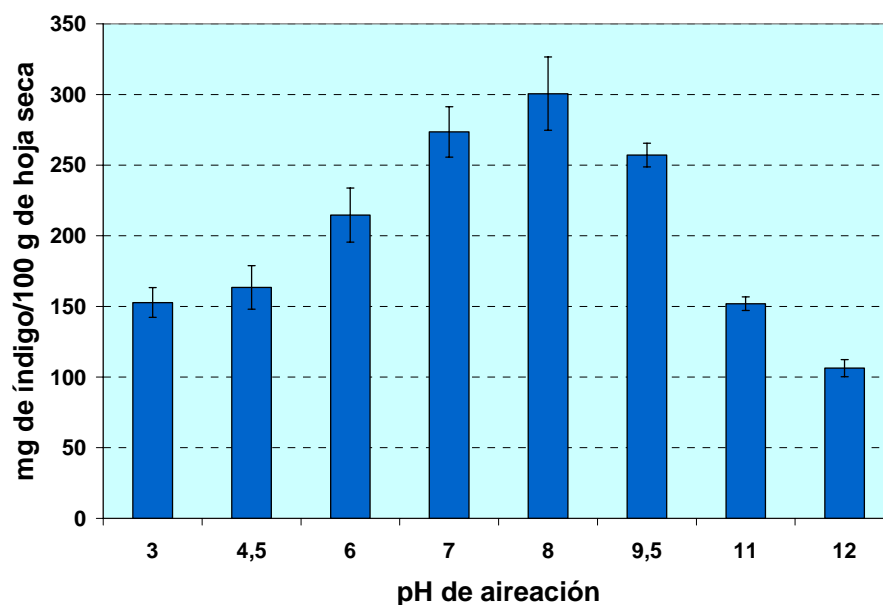


Figura IV.28. Rendimientos de índigo a diferentes pH de aireación

IVA.3. Conclusiones

- El pretratamiento de secado en estufa no dio buenos resultados debido a que a 60° C no se detuvieron las reacciones de oscurecimiento de las hojas y a 100° C se presentó descomposición del colorante.
- Los rendimientos de CAP fueron similares cuando las hojas de añil se extrajeron en fresco y cuando se extrajeron después de secarse al sol. Sin embargo, hubo un incremento del 34% en la concentración de índigo en el CAP cuando la extracción se realizó con hojas secas.
- La operación de tamizado antes de la extracción mejoró la calidad del colorante obtenido debido a que se eliminaron los tricomas de la hoja y se incremento la concentración de índigo en el CAP.
- No se encontraron diferencias significativas en los rendimientos de CAP cuando se utilizaron relaciones de extracción de Materia prima/Solvente (MP/S) de 1:20, 1:10 y 1:6.7. Sin embargo, los rendimientos disminuyeron hasta en 80% cuando se utilizó la relación MP/S de 1:4.
- El rendimiento de CAP extraído de las hojas de añil se incrementó durante las primeras seis horas de extracción y posteriormente se estabilizó. El resultado obtenido representa una reducción en los tiempos de extracción respecto a lo reportado en la literatura hasta hoy para la extracción de materia fresca por el método tradicional y a nivel laboratorio.
- No se presentó diferencia significativa en los rendimientos de extracción de CAP e índigo en el rango de temperaturas comprendido entre los 25 y 35° C. El incremento de la temperatura de extracción a 45° y 60° C provocó un incremento en la velocidad de extracción, pero una disminución en los rendimientos.
- Los valores de pH inicial del medio más apropiados para la extracción de colorantes de añil fueron 7 y 12, debido a que se obtuvieron rendimientos hasta 100% más altos que cuando se emplearon medios con pH inicial de 2, 5 y 9.

- Las soluciones alcalinas mostraron reducción de pH durante la extracción hasta alcanzar valores cercanos a la neutralidad, mientras que el pH de las soluciones ácidas presentó un incremento que también las condujo a la neutralidad. Este cambio está relacionado directamente con la concentración de índigo en el medio.
- El tiempo de aireación de las muestras después de la extracción no tuvo efecto sobre los rendimientos de CAP obtenido.
- Los rendimientos de CAP se incrementaron conforme se incrementó el pH de aireación hasta valores de 11. La concentración de índigo en el CAP también se incrementó, pero solo hasta valores de 8. A valores de pH superiores la concentración disminuyó.

SECCION IVB

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO

En la literatura se ha reportado la posibilidad de que en las plantas productoras de índigo exista una barrera física o química que impida que el precursor indicán este en contacto directo con la enzima β -glucosidasa, que cataliza su hidrólisis a indoxilo el cual posteriormente se oxida y se fusiona con otra molécula para formar el compuesto colorido (Minami, *et al*, 1997). El proceso de extracción debería por lo tanto favorecer la ruptura de esta barrera permitiendo la interacción de los diferentes componentes.

La aplicación de ultrasonido durante la extracción puede contribuir a mejorar significativamente la extracción de compuestos en plantas (Hromaádkova y Ebringerová, 2003), mediante la ruptura de las paredes celulares y el incremento en la transferencia de masa (Elisandra *et al*, 2004) o bien provocando cambios en la permeabilidad de los organelos internos de la célula e incluso el rompimiento de estas estructuras, favoreciendo la actividad de las enzimas.

En esta etapa experimental se evaluó el efecto de la extracción asistida por ultrasonido sobre los rendimientos de colorantes obtenidos de las plantas de añil. Los experimentos se realizaron en el LCA en Toulouse.

Las plantas utilizadas se cosecharon durante los meses de abril y mayo del 2004 en el Municipio de Guienagati, Estado de Oaxaca, México, después de la cosecha se secaron al sol con volteos regulares y se empacaron en polietileno y cartón para su transporte al laboratorio en Francia.

IVB.1. Extracción a nivel laboratorio

Para la extracción se utilizó un equipo de ultrasonido de cubeta de 2 litros, equipado en la parte inferior con un transductor ultrasonoro (fabricado por la empresa R.E.U.S., Francia; Figura IV.29). Las extracciones se realizaron utilizando el método EC-2 descrito en el capítulo V, de acuerdo a un experimento factorial 5 X 3 (Steel y Torrie, 1993), en el que los factores y los niveles fueron los siguientes:

1. Factor 1: pH de la solución: 2, 5, 7, 9 y 12 (Las soluciones tampón se prepararon de acuerdo al método ST-1, descrito en el Capítulo V, Robinson, 1978).
2. Factor 2: Tiempo de extracción: 50, 70, 115 minutos.

Para cada uno de los tratamientos se hicieron tres repeticiones para un total de 45 corridas de extracción, Simultáneamente se realizaron 4 corridas testigo de extracción en un reactor de 2 litros con temperatura controlada a 28° C, utilizando el método general de extracción (EC-1, Capítulo V).

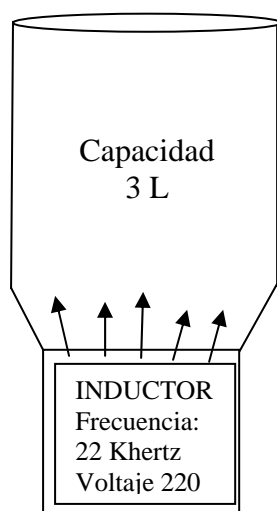


Figura IV.29. Esquema del equipo de 2 litros utilizado en la extracción de añil asistida por ultrasonido

IVB.1.1. Evaluación de la temperatura y del pH

La temperatura al interior del equipo de extracción permaneció constante durante los primeros cincuenta minutos, posteriormente se observó un ligero incremento hasta alcanzar un máximo al final de la extracción pasando de 25 a 29° C a los 115 minutos (Figura IV.30).

En los experimentos previos se determinó que al parecer no existe diferencia significativa en los rendimientos de CAP e índigo obtenidos cuando la extracción se realiza dentro del rango de temperaturas de 25 a 35 ° C (Capítulo, Sección IVA), por lo que se consideró que este parámetro no afecta los resultados obtenidos en la extracción por ultrasonido.

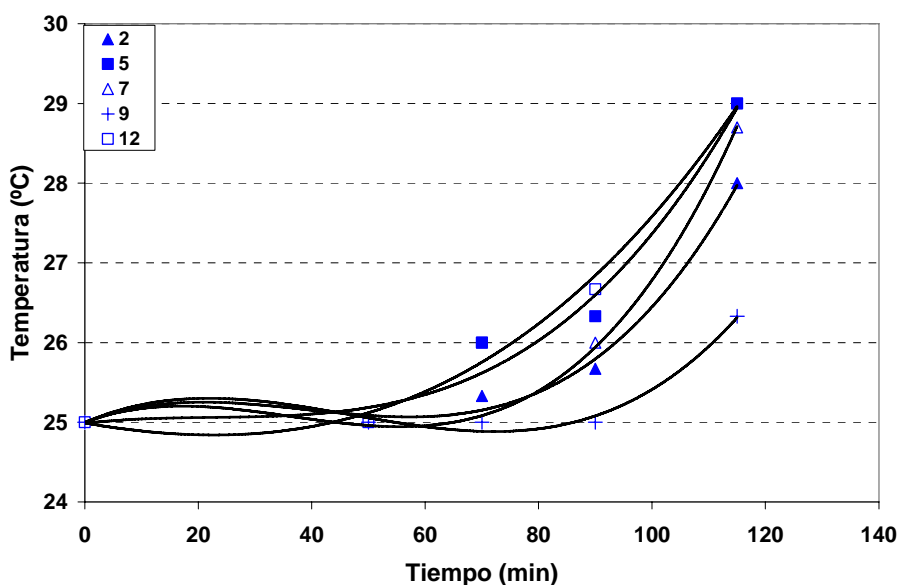


Figura IV.30. Evolución de la temperatura durante la extracción asistida por ultrasonido utilizando diferentes pH

Los valores de pH durante la extracción por ultrasonido mostraron un comportamiento similar a los obtenidos durante la extracción de colorantes de añil sin utilizar ultrasonido (Sección IVA.2.4; Figura IV.31). Los valores de pH obtenidos al final de la extracción se acercaron hacia la neutralidad, confirmando la suposición de que en la planta existen algunos compuestos que actúan como amortiguadores del pH durante la extracción.

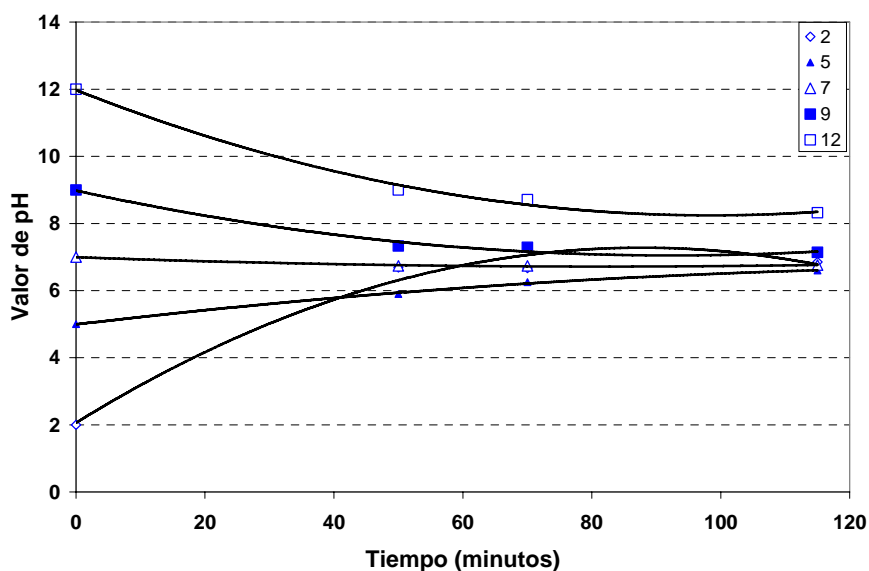


Figura IV.31. Evolución del pH durante la extracción asistida por ultrasonido de colorantes de añil

IVB.1.2. Extracción de CAP

En la Figura IV.32 se presentan los rendimientos obtenidos en los diferentes tratamientos de ultrasonido.

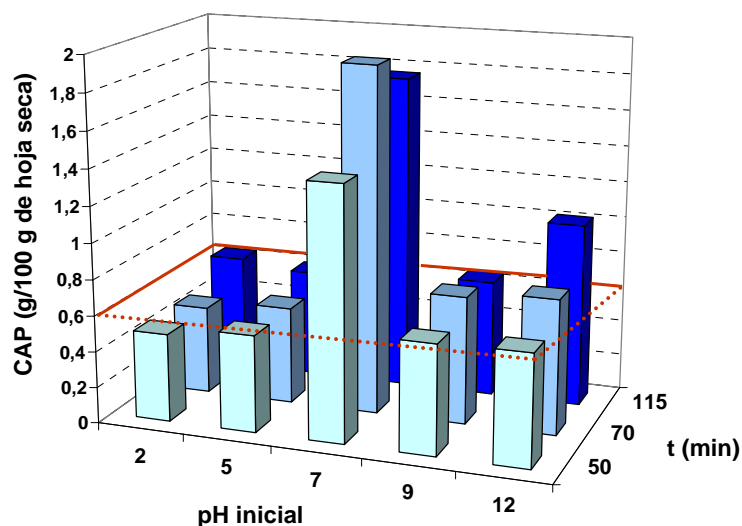


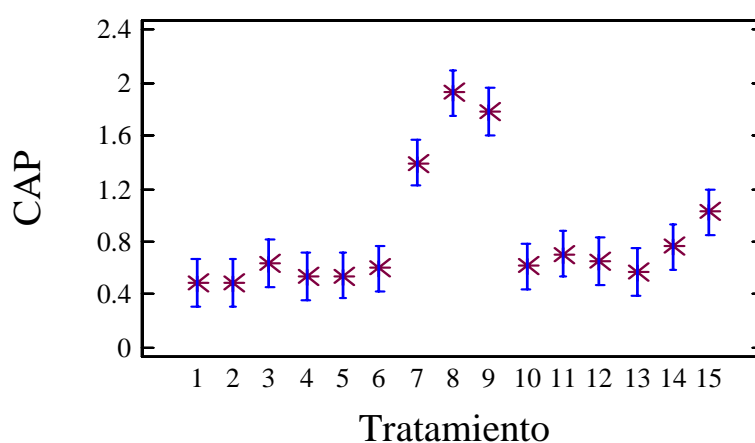
Figura IV.32. Rendimientos de CAP obtenidos durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas secas de añil. La línea punteada representa los niveles obtenidos en el tratamiento testigo extraído durante 6 h a 28° C

El análisis estadístico mostró que tanto el pH como el tiempo de extracción tienen efecto significativo sobre el rendimiento de CAP, pero que no hay un efecto derivado de la interacción de ambos parámetros (Tabla IV.2; Statgraphics Plus Windows 4.0, 1999).

Tabla IV.2. Análisis de varianza de efecto del pH y el tiempo de extracción sobre los rendimientos de CAP ($\alpha = 0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor-P
A: pH	4	8.57704	2.14426	47.89	0.0000
B: Tiempo	2	0.38068	0.190341	4.25	0.0237
Interacción	8	0.44062	0.0550776	1.23	0.3160
Residual	30	1.34280	0.0447762		

Con base en los resultados anteriores se realizó la comparación de medias de cada uno de los tratamientos para establecer las diferencias entre ellos (Figura IV.33). Los resultados mostraron que los únicos tratamientos que presentaron diferencias significativas fueron aquellos realizados a pH 12, 115 minutos y a pH 7. Los rendimientos más altos se encontraron a pH 7 (1.79 g/100 g de hoja seca). En este tratamiento el 50% del colorante se obtuvo durante los primeros 50 minutos posteriormente se incremento y se mantuvo hasta el final del tratamiento.



Tratamiento	Descripción	Muestras	Medias	Grupos homogéneos
2	2-70	3	0.487533	X
1	2-50	3	0.488633	X
4	5-50	3	0.538033	X
5	5-70	3	0.539067	X
13	12-50	3	0.5691	X
6	5-115	3	0.5959	X
10	9-50	3	0.6088	X
3	2-115	3	0.634233	X
12	9-115	3	0.6464	X
11	9-70	3	0.706867	XX
14	12-70	3	0.756867	XX
15	12-115	3	1.01987	X
7	7-50	3	1.39647	X
9	7-115	3	1.7861	X
8	7-70	3	1.92443	X

Figura IV.33. Comparación de medias de los rendimientos de CAP en diferentes tratamientos de extracción con ultrasonido. Método de diferencia mínima significativa. $\alpha = 0.05$

En la mayor parte de los tratamientos de extracción con ultrasonido los rendimientos de CAP obtenidos fueron similares a los que se logran durante la extracción normal (aprox. 0.6 g/100 g de hoja seca, Figura IV.32), pero el tiempo que se requiere para alcanzar estos valores disminuye de 360 minutos (6 horas) a 70 minutos. Este efecto podría deberse a al incremento en la velocidad de transferencia de masa como resultado del efecto cavitacional causado por la aplicación de ultrasonido (Li *et al*, 2004). La extracción con ultrasonido ha ayudado a reducir el tiempo de extracción de diferentes componentes a partir de material vegetal, entre los que se encuentran la nicotina (Zuo, *et al*, 2004), la carvona y el limoneno (Chemat *et al*, 2004), el aceite de soya y *Jatropha* (Li *et al*, 2004; Shah *et al*, 2005), los esteroides y triterpenoides (Schinor *et al*, 2004) y los jarabes (Entezari, *et al*, 2004).

IVB.1.3. Extracción de índigo

Las muestras de CAP obtenidas al final del proceso de extracción con ultrasonido (115 min) a pH ácido (2 y 5) y pH alcalino (9 y 12) mostraron una coloración azul intenso brillante, mientras que la coloración del CAP obtenido a pH neutro era de color azul claro. Cada una de las muestras se disolvió en N, N-dimetilformamida (DMF, disolución a 250 ppm) y se observó que el aspecto de las soluciones provenientes de CAP extraído a pH neutro fue de un azul menos intenso que el color de las muestras provenientes de extracciones a pH 2,5 y 9 (Figura IV.34). La intensidad en la coloración estuvo relacionada con la concentración de índigo en las muestras (Tabla IV.3), obtenida por HPTLC-densitometría (Método CI-1, Capítulo V). Por otra parte, las soluciones provenientes de muestras extraídas a pH 12 presentaron una coloración violeta sugiriendo la presencia de indirrubina.

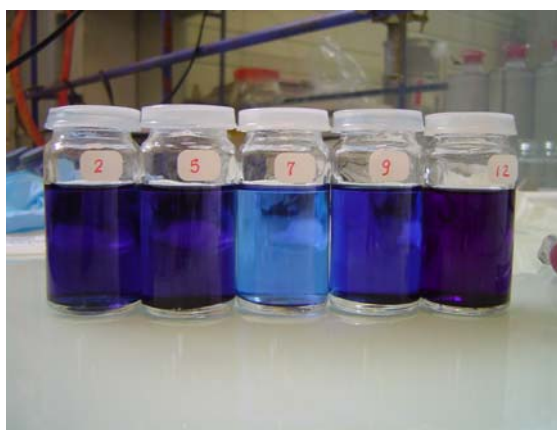


Figura IV.34. Aspecto de las muestras de CAP disueltas en DMF (a 250 ppm). Muestras extraídas con ultrasonido a diferentes Ph

Tabla IV.3. Concentración de índigo en el CAP obtenida al variar el pH y el tiempo de extracción con ultrasonido

Tiempo (min)	pH				
	2	5	7	9	12
50	20.45	10.97	17.32	18.48	24.35
70	18.23	15.42	13.44	18.30	29.71
115	20.77	18.79	15.99	19.48	22.68
Testigo (6 h, 25° C)	29.7				

En la Figura IV.35 se presentan los resultados obtenidos en el cálculo del rendimiento de índigo en las hojas secas. Al igual que en el caso del CAP el análisis estadístico mostró que existe efecto significativo sobre la concentración de índigo tanto del pH como del tiempo de extracción, pero no hay un efecto de la interacción de estos parámetros (Tabla IVB.4, Statgraphics Plus Windows 4.0, 1999).

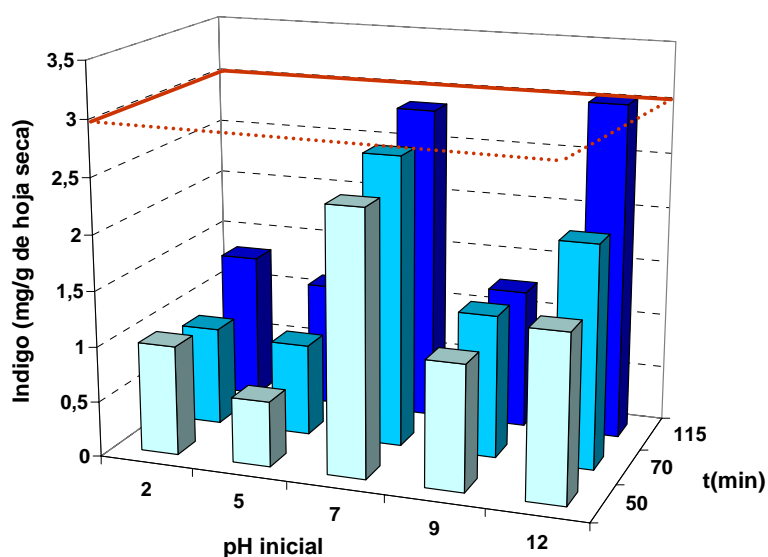
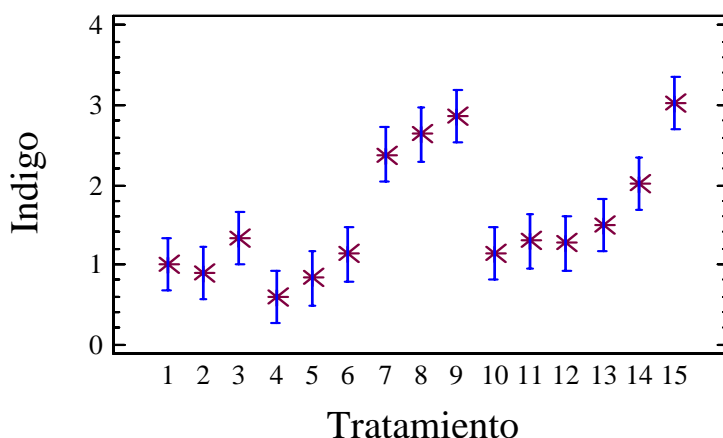


Figura IV.35. Rendimientos de índigo obtenidos durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas secas de añil. La línea punteada representa los niveles obtenidos en el tratamiento testigo extraído durante 6 h a 28° C

Tabla IV.4. Análisis de varianza del efecto de pH y el tiempo de extracción con ultrasonido sobre los rendimientos de índigo en hojas secas de añil ($\alpha = 0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor-P
A: pH	4	21.3019	5.32546	32.95	0.0000
B: Tiempo	2	2.79032	1.39516	8.64	0.0011
Interacción	8	1.97555	0.24694	1.53	0.1892
Residual	30	4.84673	0.161558		

Los tratamientos realizados a valores de pH de 2, 5, y 9 no mostraron diferencia significativa entre ellos (Figura IV.36). Por otra parte, la concentración de índigo en estos tratamientos fue mucho menor que la obtenida en el testigo (extracción sin ultrasonido). Los rendimientos más altos de índigo en las hojas se obtuvieron en los tres tiempos de extracción a pH 7 y en el tiempo final a pH 12, estos valores fueron similares a los obtenidos en el testigo. Estos resultados indican que aunque se incrementa la cantidad de CAP, disminuye la pureza por lo que la ganancia real al aplicar este tratamiento no sería en rendimiento sino en reducción del tiempo de proceso.



Tratamiento	Descripción	Muestras	Medias	Grupos homogéneos
4	5-50	3	0.591237	X
5	5-70	3	0.825933	XX
2	2-70	3	0.89328	XXX
1	2-50	3	0.993733	XXX
6	5-115	3	1.12586	XXX
10	9-50	3	1.13106	XXX
12	9-115	3	1.2618	XX
11	9-70	3	1.28874	XX
3	2-115	3	1.32668	XX
13	12-50	3	1.49817	XX
14	12-70	3	2.01187	XX
7	7-50	3	2.37825	XX
8	7-70	3	2.63495	XX
9	7-115	3	2.85641	X
15	12-115	3	3.02862	X

Figura IV.36. Comparación de medias de los rendimientos de índigo en diferentes tratamientos de extracción con ultrasonido. Método de diferencia mínima significativa. $\alpha = 0.05$

IVB.1.4. Extracción de indirrubina

El efecto de las condiciones de extracción con ultrasonido fue más evidente en el rendimiento de indirrubina obtenido por HPTLC-densitometría (Figura IVB.37). A diferencia del CAP y del índigo, el análisis estadístico mostró que existe efecto significativo del pH y del tiempo de extracción, así como de la interacción de los dos parámetros (Tabla IV.5, Figura IV.38) sobre este compuesto. Excepto el tratamiento a pH 12, los valores de indirrubina fueron similares a los obtenidos con el tratamiento testigo. A pH 12 la concentración de indirrubina se incrementó conforme se incrementó el tiempo de extracción. Estos resultados son concordantes con lo reportado por Matadamas-Ortiz, (2002), quien menciona que la producción de indirrubina en *Isatis tinctoria* se incrementa a

valores de pH básicos. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, la coloración púrpura de los extractos obtenidos a pH 12 confirma la hipótesis de que la coloración del CAP tiene relación directa con el contenido de índigo e indirrubina

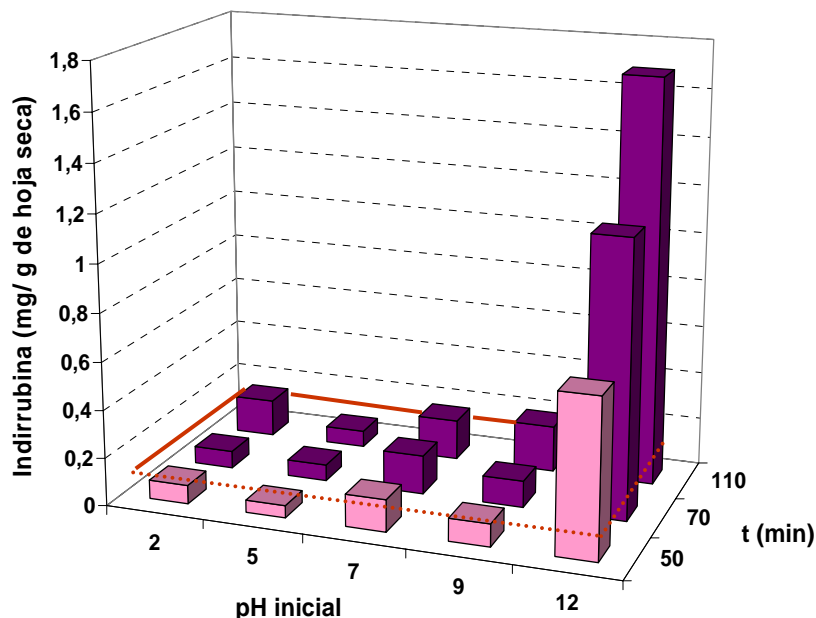


Figura IV.37. Rendimientos de indirrubina obtenidos durante la extracción asistida por ultrasonido de hojas secas de añil. La línea roja representa los niveles obtenidos en el tratamiento testigo extraído durante 6 h a 28° C

Tabla IV.5. Análisis de varianza del efecto de pH y el tiempo de extracción con ultrasonido sobre los rendimientos de indirrubina en hojas secas de añil ($\alpha = 0.05$)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor-P
A: pH	4	125718.0	31429.5	2471.42	0.0000
B: Tiempo	2	2905.67	1452.84	114.24	0.0000
Interacción	8	6105.87	763.233	60.02	0.0000
Residual	30	381.514	12.7171		

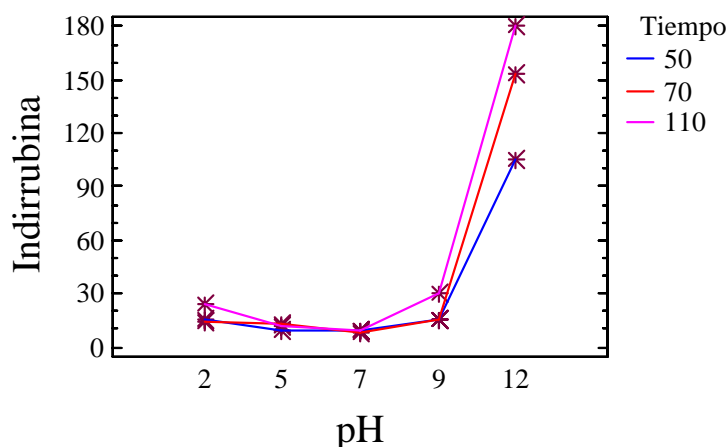


Figura IV.38. Gráfica de interacciones de los factores de extracción de indirrubina realizada con ultrasonido. ($\alpha = 0.05$).

IVB.2. Extracción en equipo de 30 L

IVB.2.1. Extracción sin control de pH

Antes de realizar los experimentos de extracción a pH controlado en el equipo de 30 litros (Figura IV.39) se hicieron algunas pruebas preliminares de extracción (la materia prima utilizada en esta sección provenía de una muestra de hoja cosechada durante el otoño de 1999, en el estado de Jalisco México). Se utilizaron muestras de 2 kg de hoja seca, las cuales se extrajeron con 20 L de agua destilada (Figura IV.40). El método de extracción utilizado fue el EC-2 descrito en materiales y métodos y la evaluación del índigo se hizo por HPTLC-densitometría.

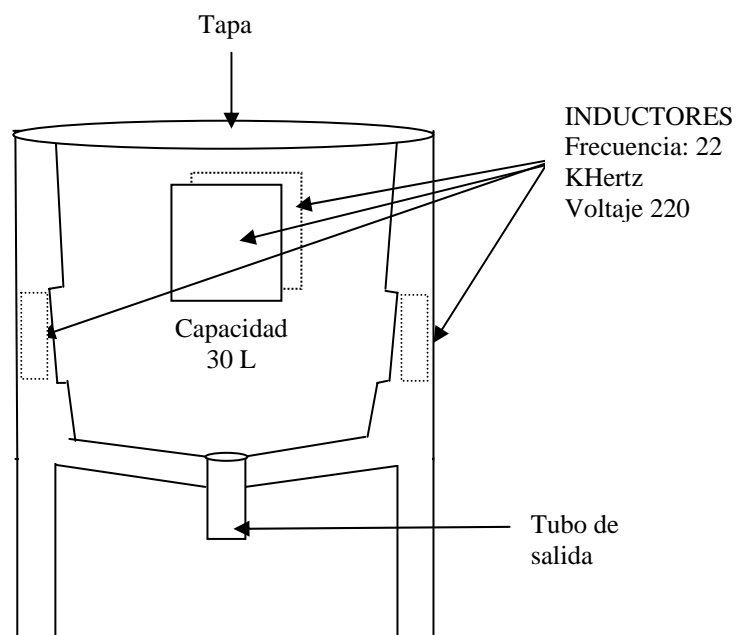


Figura IV.39. Esquema del equipo de 30 litros utilizado en la extracción de añil asistida por ultrasonido



Figura IV.40. Extracción de añil en equipo de ultrasonido de 30 L

Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras IVB.41 y IVB.42. Los rendimientos de CAP se incrementaron conforme se incrementó el tiempo de extracción, sin embargo, en la gráfica se puede observar que la velocidad de extracción es mayor en los primeros

tiempos y que se va reduciendo a medida que avanza el tiempo de tratamiento, hasta que la curva se hace casi asintótica a valores cercanos 0.6 g/100 g de hoja seca, los rendimientos de CAP obtenidos al final de la extracción fueron similares a los obtenidos en el tratamiento testigo (6 h, 28°C).

Los rendimientos de índigo mostraron la misma tendencia al incremento conforme avanzaba el tiempo de extracción. A diferencia de lo obtenido en el caso de CAP, después de los 90 minutos de extracción se observó una disminución de los rendimientos de extracción, lo que indica que a pesar de que se siguen extrayendo componentes de las hojas después de este periodo, el CAP tiene menor pureza. Los rendimientos obtenidos al final de la extracción fueron mayores que los obtenidos en el tratamiento testigo.

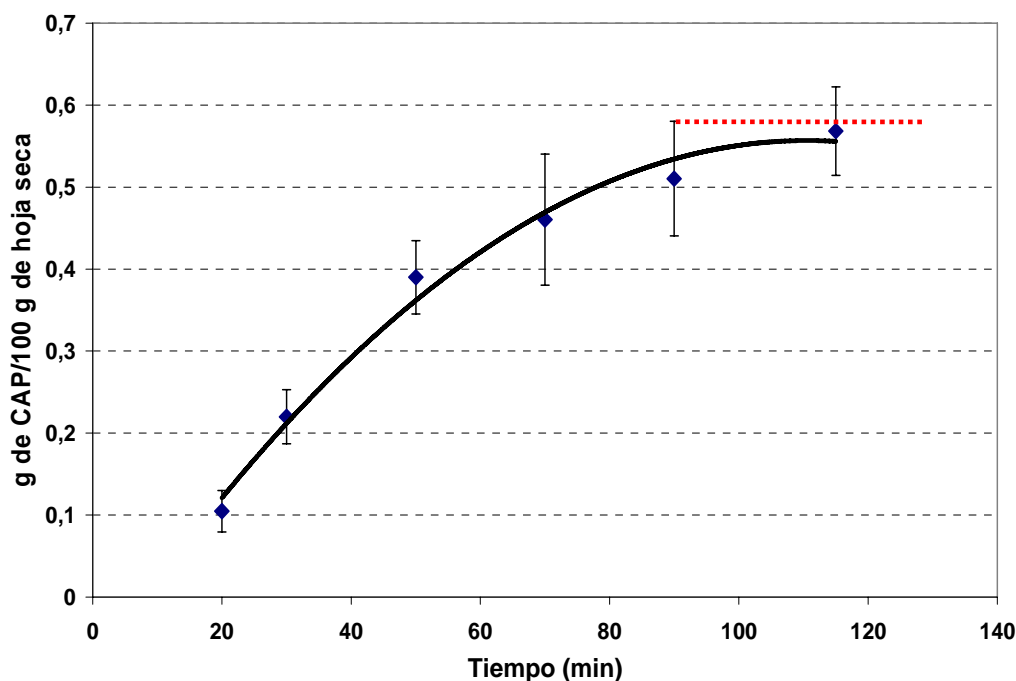


Figura IV.41. Rendimientos de CAP obtenidos a diferentes tiempos utilizando el equipo de extracción con ultrasonido de 20 L. La línea punteada representa el rendimiento obtenido en el tratamiento testigo: sin ultrasonido, 6 h, 28° C

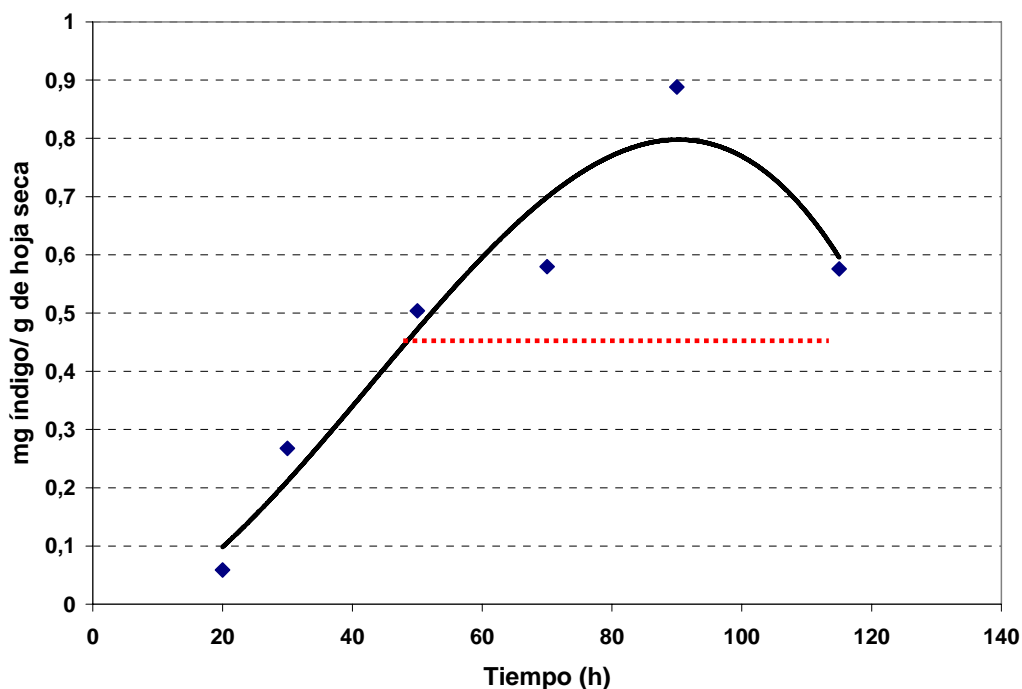


Figura IV.42. Rendimientos de índigo obtenidos a diferentes tiempos utilizando el equipo de extracción con ultrasonido de 20 L. La línea punteada representa el rendimiento obtenido en el tratamiento testigo: sin ultrasonido, 6 h, 28° C

IVB.2.2. Extracción a pH controlado

El ultrasonido incrementa la difusión de las sustancias disueltas dentro de las células presentes en medio de extracción. La pérdida de energía dentro del sistema puede provocar una reducción de la eficiencia (Vilarem, 1997). El escalamiento del proceso podría influir sobre la pérdida de energía debido a que se modifica la configuración de los equipos y se incrementa la distancia entre el generador de ultrasonido y el material vegetal

Con base en los resultados obtenidos en la extracción con ultrasonido a nivel laboratorio, la extracción de añil en el equipo de 30 litros se realizó en los tratamientos de pH inicial de 7 y 12. Para la extracción del CAP y la cuantificación de índigo se utilizaron los mismos métodos descritos en la sección anterior. La cuantificación de indirrubina se realizó por HPTLC-densitometría.

Los experimentos realizados a nivel semi-piloto mostraron resultados similares a los obtenidos a nivel laboratorio (Figuras IV.43 y IV.44).

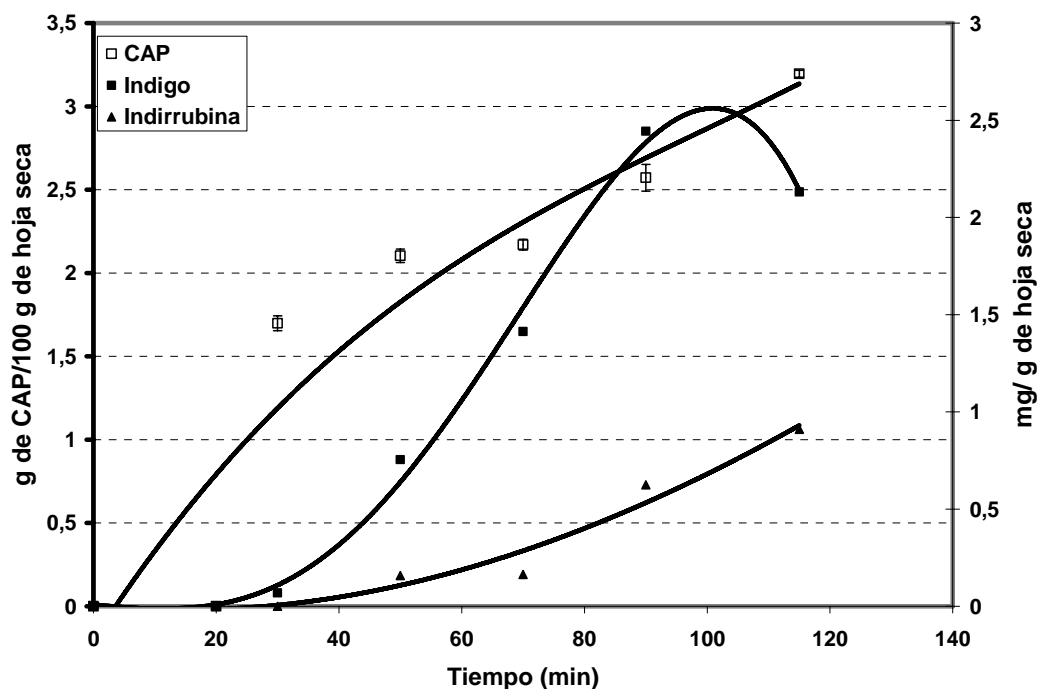


Figura IV.43. Evaluación de extracción con ultrasonido en el equipo de 30 L utilizando como solvente una solución tampón a pH 7

A valores de pH 7, los rendimientos de CAP se incrementaron conforme aumentó el tiempo de extracción. Se puede observar la curva mantiene su tendencia al incremento hasta el tiempo final considerado en este experimento (115 min, Figura IV.43). Este mismo comportamiento se observa en los rendimientos de indirrubina. Al igual que en los experimentos anteriores los rendimientos de índigo disminuyen después de los 90 minutos de extracción, pero los rendimientos de indirrubina continúan aumentado. Este comportamiento podría deberse a un posible proceso de isomerización del índigo hacia indirrubina.

A valores de pH 12 se encontró que a pesar de que se detuvo el incremento en el rendimiento de CAP e índigo, la concentración de indirrubina continuo aumentando (Figura IV.44). Este resultado confirma la teoría de una posible degradación y conversión del índigo a indirrubina. Hasta la fecha no existe ningún reporte en el que se mencione esta posibilidad.

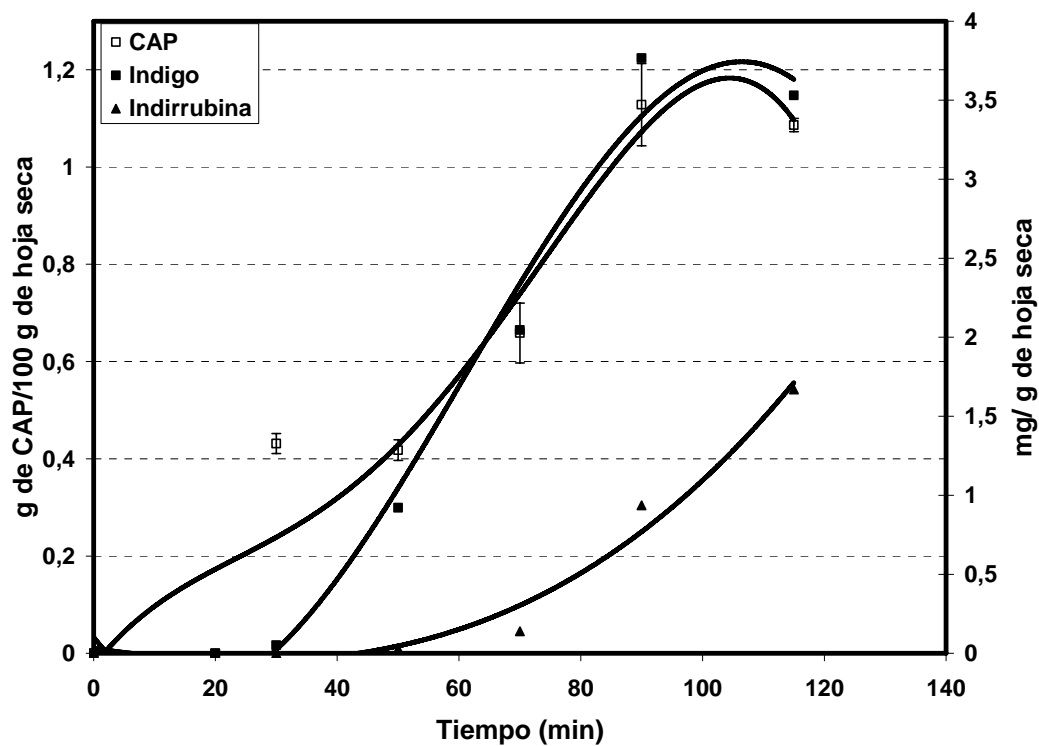


Figura IV.44. Evaluación de extracción con ultrasonido en el equipo de 30 L utilizando como solvente una solución tampón a pH 12

IVB.3. Conclusiones

- El incremento de la temperatura del medio durante la extracción asistida por ultrasonido no influyó sobre los rendimientos obtenidos. Al igual que en los experimentos preliminares, el pH de los extractos evolucionó hacia la eutralidad al final de la extracción.
- Tanto el pH como el tiempo de extracción mostraron efecto significativo sobre el rendimiento de CAP y de índigo, pero no se encontró efecto significativo de la interacción de estos parámetros. Los rendimientos más altos de CAP (1.79 g/100 g de hoja seca) e índigo (3 mg/g de hoja seca) obtenidos a pH 7 en el primer caso y pH 12 y 7 en el segundo fueron similares a los obtenidos en el tratamiento testigo pero se observó una fuerte disminución en el tiempo de extracción desde 6 hasta 2 horas.
- A pesar de que en la extracción asistida por ultrasonido a pH 7 se obtuvieron mayores rendimientos de CAP, la calidad de este producto es menor que en el resto de los tratamientos debido a que presentó menor contenido de índigo.
- La extracción de indirrubina estuvo influenciada por el pH, el tiempo de extracción y la interacción de estos dos parámetros. Los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 12 (1.6 mg/g de hoja seca). Estos valores fueron superiores a los obtenidos en el tratamiento testigo (0.2 mg/g de hoja seca). A pH 12 los rendimientos de indirrubina se incrementaron conforme se incrementó el tiempo de extracción.
- Los resultados de CAP e índigo obtenidos en el extractor de 30L fueron concordantes con los obtenidos a nivel laboratorio. Aunque los rendimientos de índigo disminuyen al final de la extracción, la concentración de indirrubina sigue aumentando hasta el tiempo final (115 min).

CAPITULO V

METODOLOGIAS EXPERIMENTALES

Indice de contenido

V.1. Métodos de extracción de CAP

V.1.1. Método general de extracción (EC-1)

V.1.2. Extracción por ultrasonido (EC-2)

V.2. Preparación de soluciones tampón para ajuste de pH (ST-1)

V.3. Cuantificación de CAP

V.4. Métodos de extracción y cuantificación de índigo

V.4.1. Cuantificación por HPTLC-densitometría

V.4.2. Método espectrofotométrico

V.5. Extracción y cuantificación de indirrubina

V.6. Extracción y cuantificación de taninos

V.7. Preparación de muestras para microscopía

V.7.1. Fijación en parafina

V.7.2. Fijación en polietilenglicol

V.8. Bibliografía

CAPITULO V METODOLOGIAS EXPERIMENTALES

V.1. Métodos de extracción de CAP

V.1.1. Método general de extracción (EC-1).

El método general utilizado durante la experimentación para la extracción de colorantes en las plantas de añil se describe a continuación en la Figura V.1.

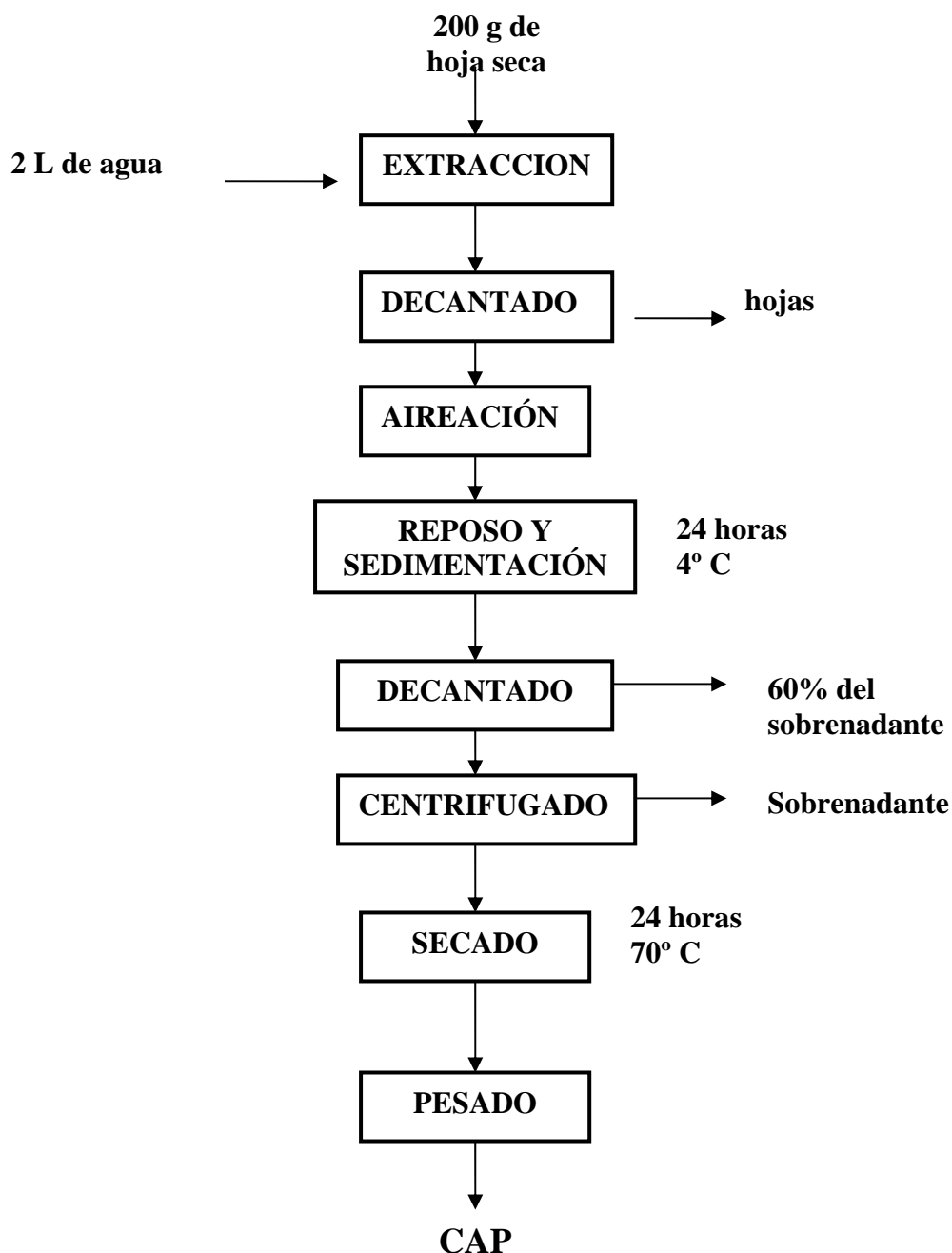


Figura V.1. Método general de extracción de colorantes en plantas de añil

V.1.2. Extracción por ultrasonido (EC-2)

Para la extracción de colorantes empleando ultrasonido se hicieron algunas modificaciones a la metodología general de extracción, el procedimiento se describe en la Figura V.2.

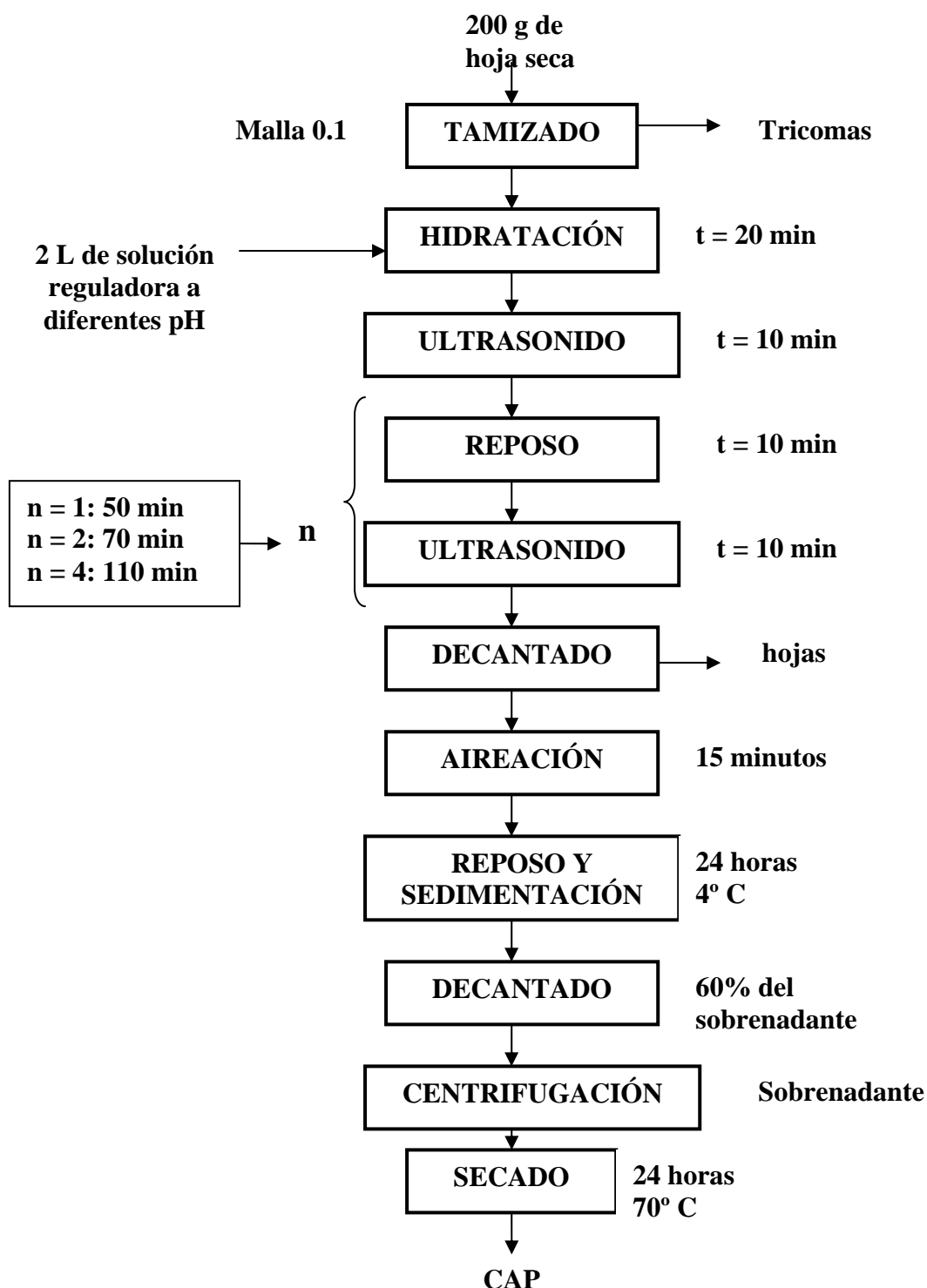


Figura V.2. Procedimiento general de extracción con ultrasonido de colorantes de plantas de añil

V.2. Preparación de soluciones tampón para ajuste de pH (ST-1)

La preparación de las soluciones tampón a diferentes pH se hizo de acuerdo a lo descrito por Robinson (1978). Las cantidades y concentración de las soluciones madre utilizadas en cada corrida se presentan en la Tabla V.1. En cada caso la solución final se aforo a 2 L y se determinó y ajustó el pH a los valores requeridos.

Tabla V.1. Cantidad y concentración de soluciones madre utilizadas en la preparación de soluciones tampón a diferentes valores de pH

pH	Solución A			Solución B		
	Reactivo	Cantidad (mL)	Concentración (M)	Reactivo	Cantidad (mL)	Concentración (M)
2	KCl	500	0.2	HCl	130	0.2
5	Phtalato de K hidrogeno	1000	0.1	NaOH	552	0.1
7	NaOH	582	0.1	KH ₂ PO ₄	1000	0.1
9	Borato de sodio	1000	0.025	HCl	9.2	0.1
12	KCl	500	0.2	NaOH	160	0.2

V.3. Cuantificación de CAP (CC-1)

La cuantificación de Colorante Azul en Polvo (CAP) se hizo por peso seco, en cada uno de los tratamientos realizados en este trabajo las muestras de pasta del colorante obtenidas después de la centrifugación se pusieron en charolas de aluminio previamente secadas a peso constante. Posteriormente, se secaron en estufa a 70°C, durante 24 h. Finalmente las muestras secas se pesaron y se realizaron los cálculos de rendimiento.

V.4. Métodos de extracción y cuantificación de índigo

V.4.1. Cuantificación por HPTLC-densitometría (CI-1)

La concentración de índigo en los extractos de CAP se determinó por Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) y densitometría. Se utilizaron placas de sílica gel de HPTLC de vidrio 60 F₂₆₄, de 10 X 10 cm (MERCK). El solvente utilizado para el desarrollo de las placas fue tolueno: acetato de etilo en proporción 60:40.

Las muestras de colorante se molieron en un mortero, posteriormente se pesaron 10 mg y se disolvieron en 20 mL de N,N-dimetilformamida. Las soluciones se sonicaron durante 1 minuto y se filtraron empleando papel filtro Watman No. 1. En cada una de las placas se aplicaron 2 muestras de 10 µL de colorante y 4 muestras de estándar de índigo (SIGMA) a concentraciones de 0.04, 0.08, 0.12 y 0.16 g/L, para dar un total de seis manchas de 5 mm de longitud y 1 mm de anchura, a distancias de 1.5 cm entre cada mancha. La aplicación de las muestras en las placas se hizo utilizando un dosificador (DESAGA AS 30).

Antes de iniciar el desarrollo de las placas las manchas se secaron completamente con ayuda de una secadora y la cámara se saturó con la fase móvil. El desarrollo de las placas se completó cuando el frente del solvente alcanzó los 8 cm de altura (aprox. 10 min). Posteriormente las placas se sacaron de la cámara cromatográfica y se secaron. Durante toda la determinación las muestras se protegieron de la luz para evitar su descomposición.

La concentración de índigo se determinó por densitometría a 610 nm empleando un densitómetro CD60 DESAGA HEIDELBERG, el cual genera un cromatograma para cada una de las manchas (Figura V.3). El equipo integra en forma automática el área bajo las gráficas y construye una curva de calibración con los estándares (Figura V.4) y por interpolación calcula la concentración de las muestras. Cada una de las replicas de las muestras se evaluó por duplicado.

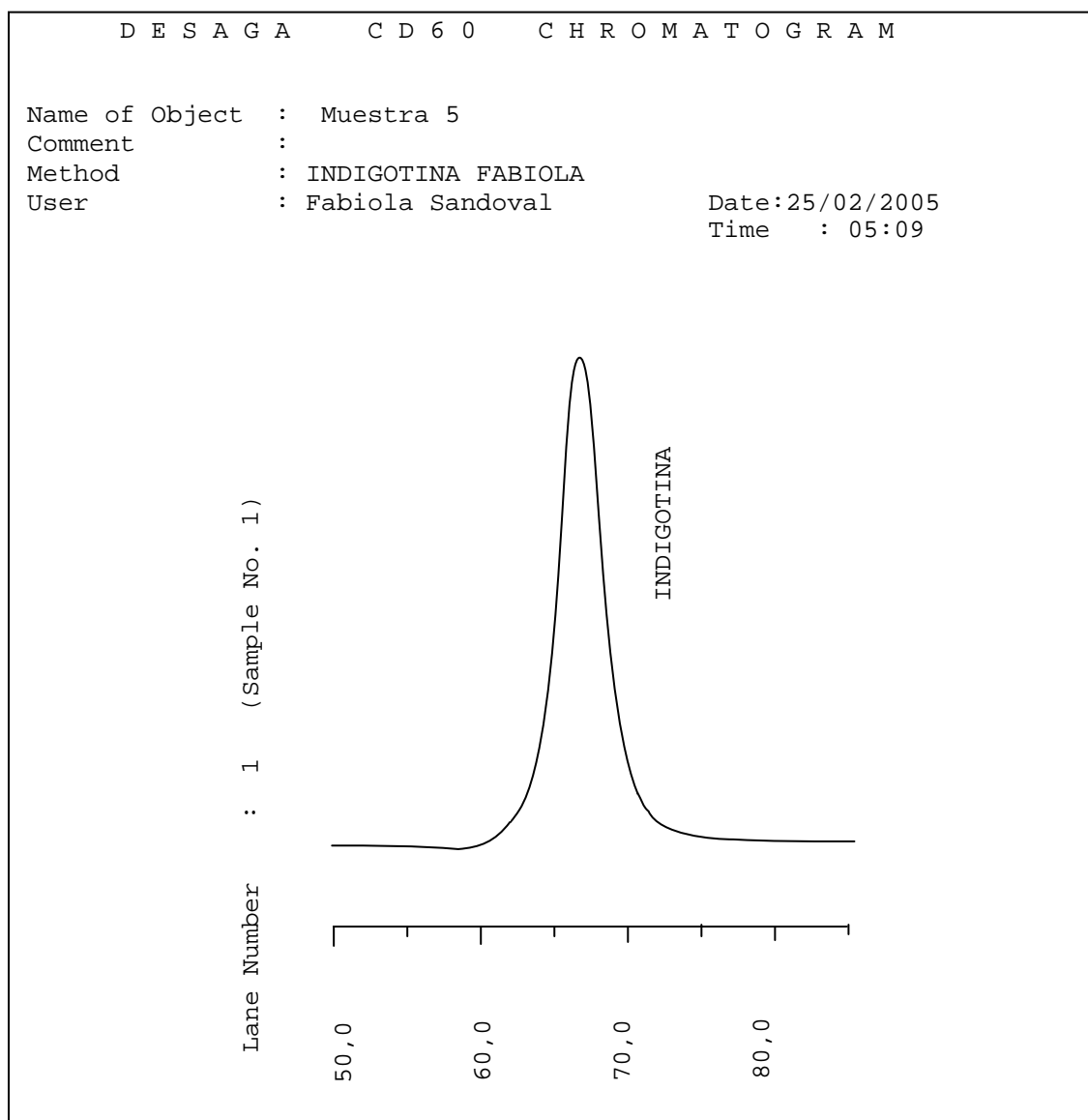


Figura V.3. Cromatograma de índigo obtenido durante la lectura en el densitómetro. Fase estacionaria: placas de sílica gel de HPTLC de vidrio 60 F₂₆₄, de 10 X 10 cm (MERCK); Fase móvil: 60:40 tolueno:acetato de etilo; Detección por densitometría a 610 nm

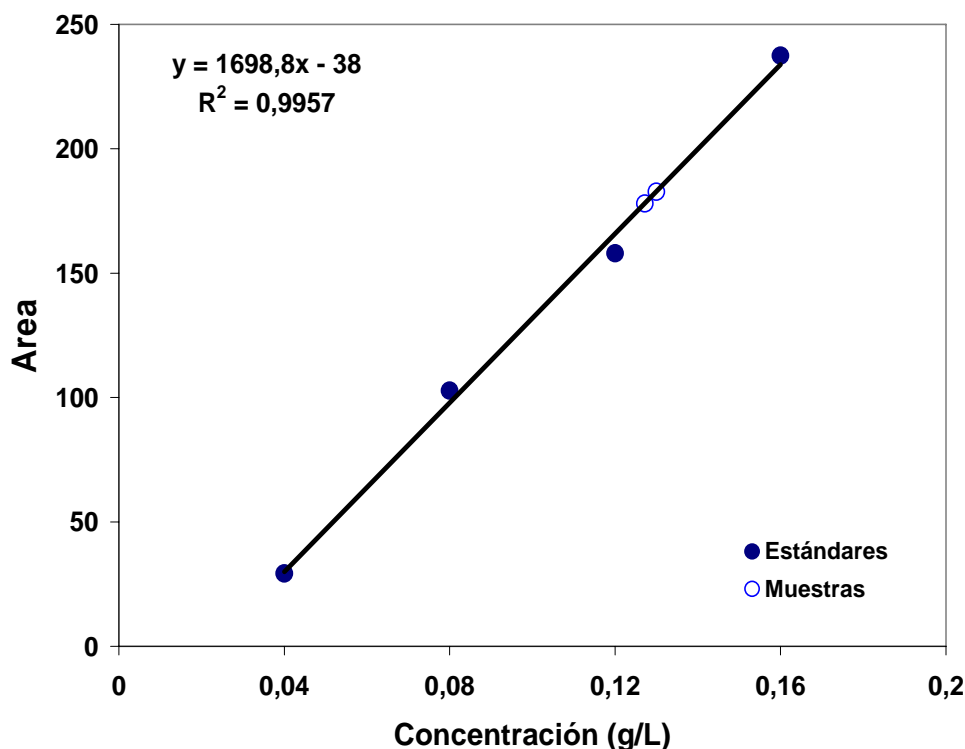


Figura V.4. Curva de calibración de índigo. En la gráfica se observa la posición de una muestra de CAP obtenido de plantas de añil depositada dos veces en la misma placa

V.4.2. Método espectrofotométrico (CI-2)

Para la determinación de índigo por espectrofotometría las muestras se disolvieron de acuerdo al procedimiento descrito en la Figura V.5. Previamente a la determinación se construyó una curva de calibración a 600 nm (Figura V.6), utilizando con un estándar de índigo (SIGMA) disuelto en ácido acético:cloroformo (50:50). La concentración de las muestras se determinó empleando la ecuación lineal resultante de la curva de calibración. Cada una de las replicas experimentales se evaluó por duplicado.

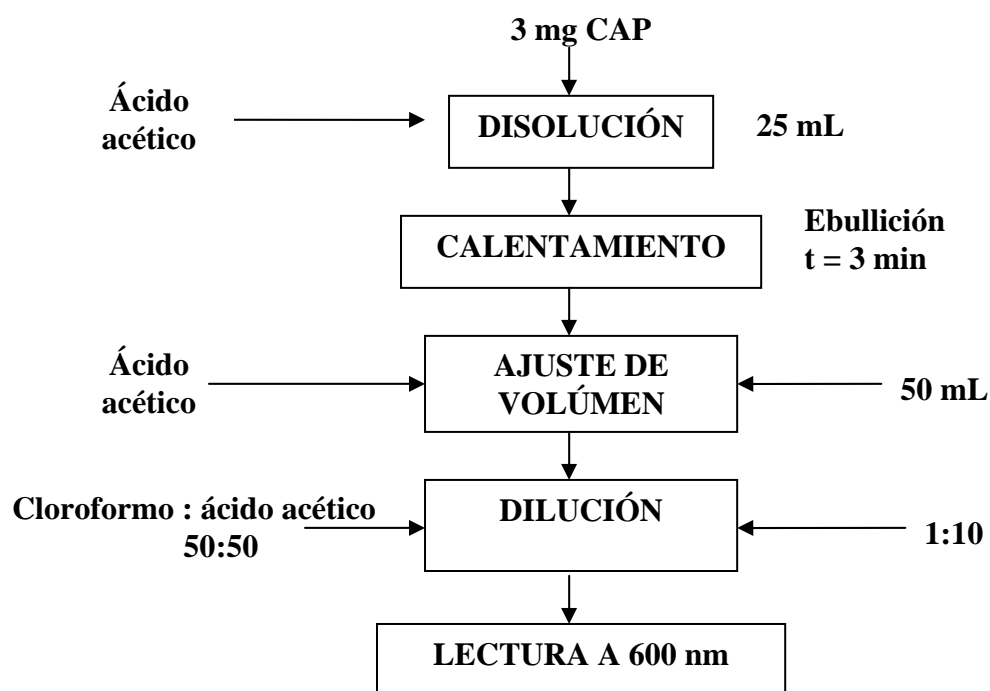


Figura V.5. Determinación de índigo por espectrofotometría. Procedimiento utilizado para la disolución de muestras de CAP

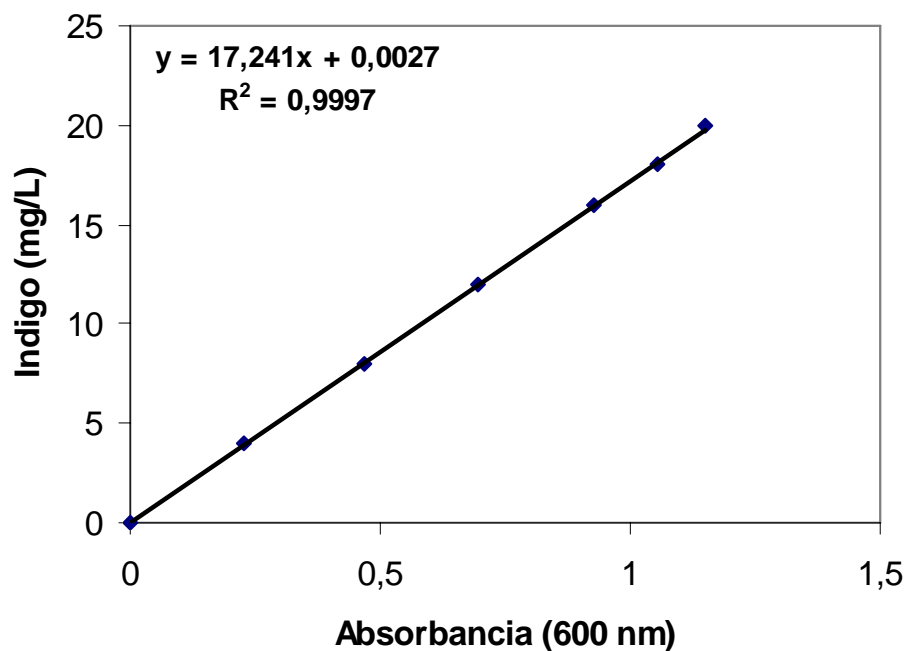


Figura V.6. Determinación de índigo por espectrofotometría. Curva de calibración a 600 nm

V.5. Extracción y cuantificación de indirrubina

La determinación del contenido de indirrubina en las muestras de CAP se realizó empleando muestras de entre 20 a 100 mg de CAP. Las muestras se extrajeron con un volumen aproximado de 150 mL de acetona. Posteriormente, los extractos se concentraron a sequedad en un rotavapor, se redisolviéron en 20 mL de N,N-dimetilformamida y se analizaron por HPTLC-densitometría de forma similar a los análisis de índigo. En este caso, la lectura se realizó a 550 nm utilizando como fase móvil Tolueno-Acetato de etilo 40:60.

En las Figuras V.7 y V.8 se presenta un ejemplo del cromatograma generado por el equipo y de la curva de calibración obtenida.

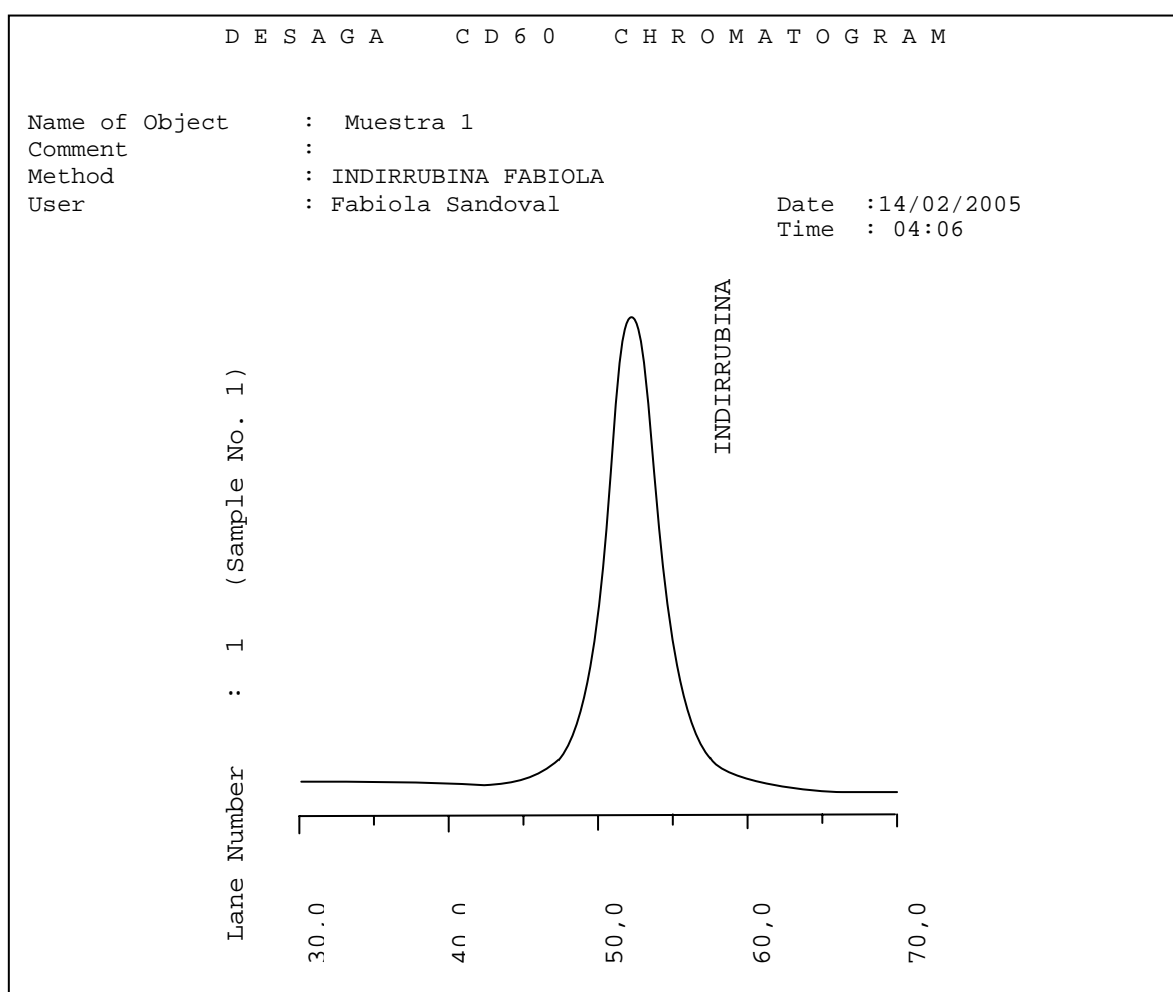


Figura V.7. Cromatograma de indirrubina obtenido durante la lectura en el densitómetro. Fase estacionaria: placas de sílica gel de HPTLC de vidrio 60 F₂₆₄, de 10 X 10 cm (MERCK); Fase móvil: 40:60 tolueno:acetato de etilo; Detección por densitometría a 550 nm

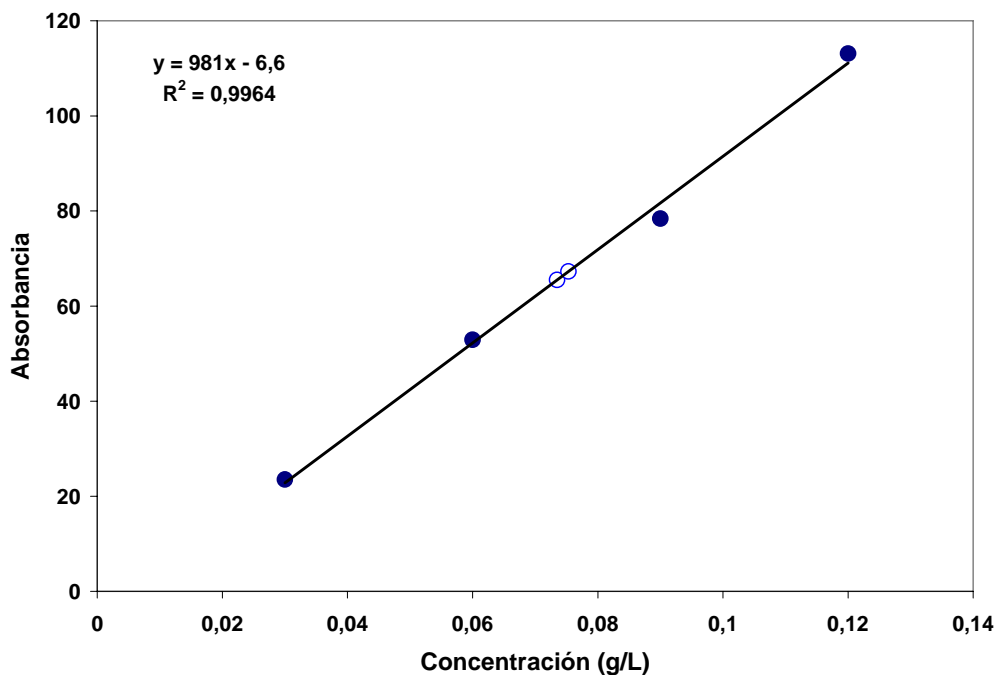


Figura V.8. Curva de calibración de indirrubina. En la gráfica se observa la posición de una muestra de CAP obtenido de plantas de añil depositada dos veces en la misma placa

El estándar de indirrubina utilizado en los análisis se obtuvo por síntesis química de acuerdo al procedimiento descrito por Thomas (1998).

V.6. Extracción y cuantificación de taninos

La extracción de taninos se realizó por el método para la extracción de fenólicos descrito por Cardador-Martínez *et al* (2002). Muestras de 2 g de hoja seca se molieron en un mortero y se les adicionó 50 mL de metanol. Las muestras se incubaron en agitación (100 rpm) durante 2 horas protegiéndolas de la luz. Después de la extracción se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se tomaron alícuotas de 20 μ L para la cuantificación.

La cuantificación de taninos se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2001). Muestras de 20 μ L se mezclaron con 1.58 mL de agua y 100 μ L de reactivo de Folin y se incubaron 8 minutos a 25° C. Posteriormente, se añadió a la mezcla 300 μ L de solución saturada de carbonato de sodio y las muestras se incubaron a 40° C durante 30 minutos. Finalmente, se leyó la absorbancia a 755 nm, en un espectrofotómetro (CINTRA), utilizando como blanco una muestra de 20 μ L de agua preparada con el mismo procedimiento.

La curva de calibración se construyó utilizando un estándar de ácido gálico diluido en metanol a concentraciones de 0 a 500 mg/L (Figura V.9).

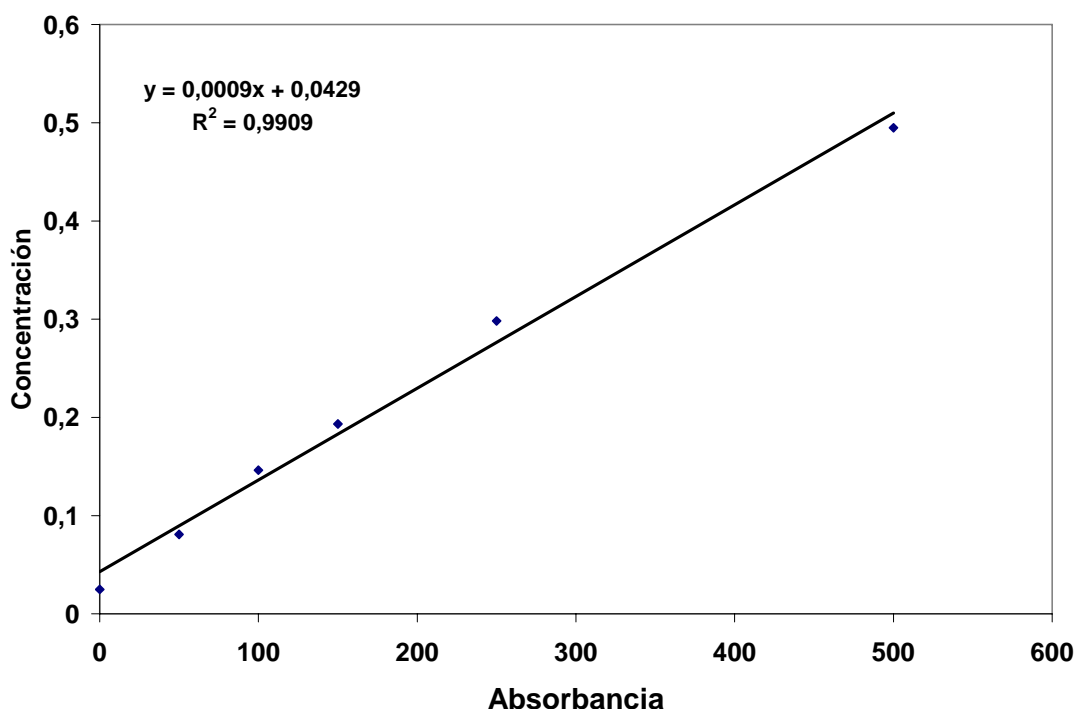


Figura V.9. Curva de calibración para determinación de taninos

V.7. Preparación de muestras para microscopía

V.7.1. Fijación en parafina

a) Preparación de material vegetal y deshidratación

Las hojas frescas de tres meses de edad se cortaron en tres fragmentos con ayuda de una navaja. Los fragmentos se colocaron en un frasco de vidrio conteniendo agua, después de la aplicación de vacío se procedió a la deshidratación utilizando las series de que se describen a continuación.

1. Incubación en soluciones de etanol desde 30% hasta 100% con intervalos de 10% de incremento cada hora.

2. Isopropanol:etanol en proporción de 1:2 durante 30 minutos
3. Isopropanol:etanol 1:1, 30 minutos
4. Dos recambios de isopropanol al 100% a intervalos de una hora.

b) Inclusión en parafina y montaje de los cortes.

Una muestra de parafina de aproximadamente 5 g se incubo en una estufa a 70°C durante 12h, posteriormente se adicionaron muestras de 1 g aprox. Cada 24 h, durante 6 días para permitir su licuefacción completa. La inclusión de las hojas se hizo colocandolas verticalmente en un molde de acero inoxidable de 1.5 X 1.5 X 1.5 cm con ayuda de unas pinzas de disección y vaciando la solución de parafina. Los recipientes se mantuvieron a congelación a -20° durante 48 h para favorecer la solidificación. Posteriormente se hicieron cortes transversales de 20 µm de espesor en un microtomo y se montaron en portaobjetos en hileras de 5 cortes cada uno con la ayuda de una solución de formaldehído al 3%. Finalmente las muestras se dejaron secar durante 12 horas.

c) Tinción

Para la tinción los portaobjetos conteniendo los cortes de hojas de añil se trataron con el siguiente procedimiento:

1. Xilol al 100% durante una hora, seguido por xilol al 100% durante una hora y una solución xilol:etanol 50:50 durante 30 minutos.
2. Incubación en soluciones de etanol en orden decreciente dando tiempos de 30 minutos entre cada recambio de solución. Las concentraciones de etanol en agua que se utilizaron fueron 100, 96, 70, 50, 30, 15 y 0 %.
3. Tinción con safranina al 1% en solución acuosa durante 48 horas.
4. Lavado con soluciones de etanol de concentración creciente, *ie*, 30, 50, 70, 80 y 96, las muestras se mantuvieron de 5 a 10 min en cada una de las soluciones.
5. Tinción por inmersión en solución de verde rápido durante 4 minutos.
6. Lavado con etanol al 96% durante cinco minutos, dos lavados con etanol al 100% durante cinco minutos y dos lavados con xileno al 100% durante cinco minutos.
7. Observación al microscopio óptico.

V.7.2. Inclusión en Polietilenglicol (PEG)

El PEG es considerado un buen material para la inclusión de tejidos vegetales debido a que tiene un punto de ebullición bajo (alrededor de 50° C) y es soluble e inocuo para la salud. Este producto posee características físicas similares a la parafina y no necesita disolución con solventes orgánicos (De Magistris, *et al*, 2000).

Al igual que en la sección VI.7.1 las hojas se coloraron verticalmente en recipientes metálicos y se vertió PEG licuado a 50° C, las muestras se dejaron enfriar y posteriormente se realizaron cortes de 20 μ M, los cuales se montaron en portaobjetos y se observaron directamente al microscopio óptico.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El índigo es considerado uno de los productos comerciales de mayor importancia histórica y económica. Debido a la popularidad contemporánea de la mezclilla y a sus diferentes aplicaciones permanece como un importante producto industrial (Tastch and Scharader, 1995; García-Macías and John, 2004). La producción de este colorante a partir de plantas fue desplazada casi en su totalidad a finales del siglo XVIII cuando se comenzó a comercializar el índigo sintético. El incremento en la búsqueda de tecnologías sustentables de productos y la demanda por parte de los consumidores de productos naturales ha reavivado el interés en la producción de este colorante a partir de cultivos agrícolas (Eyal and Spencer, 1991). Se conoce que este colorante es producido principalmente por plantas de las especies *Indigofera suffruticosa*, *Isatis tinctoria* y *Polygonum tinctorium*. Sin embargo, el cultivo de estas plantas con miras a su posible explotación comercial requiere investigación previa acerca de la influencia de la etapa de cosecha, del almacenamiento del material vegetal y del proceso de extracción sobre la producción de colorantes (Bechtold, 2002).

El presente estudio se enfocó principalmente a la caracterización del crecimiento y la producción de colorantes de plantas de la especie *Indigofera suffruticosa* Mill (añil) durante un ciclo de cultivo así como a la optimización de su proceso de extracción.

Durante el establecimiento de los cultivos se observó que las condiciones de almacenamiento de las semillas de añil, principalmente la humedad relativa, afecta la viabilidad de las semillas, lo cual se refleja en la disminución del porcentaje de germinación. Aunque la germinación de estas semillas inició a los 7 días después de la siembra, los primeros brotes de hojas verdaderas aparecieron hasta los 45 días. A partir de este momento las plántulas se desarrollaron de manera exponencial tanto en altura como en acumulación de biomasa (hojas) durante aproximadamente 3.5 meses. Al final de esta etapa se presentó la floración de las plantas seguida por la detención de crecimiento. A pesar de que se ha reportado que la estructura del suelo más apropiada para el desarrollo de plantas de añil es la arcillosa (Ku, 1997), los resultados de este trabajo mostraron mejor desarrollo aéreo y radicular de las plantas en suelos arenosos.

Respecto a la producción, los rendimientos más altos de CAP por planta se presentaron durante la fase de crecimiento exponencial y disminuyeron durante la fase estacionaria,

mientras que el contenido máximo de índigo se obtuvo al inicio de la floración y disminuyó también durante la fase estacionaria. Los rendimientos por hectárea máximos de CAP e índigo se obtuvieron al inicio de la etapa estacionaria, cuando los valores máximos de crecimiento y producción coincidieron. Con base en estos resultados, se estableció que la etapa más apropiada para realizar la cosecha es a los 5 meses después de la siembra y para las condiciones de la región de cultivo coincidió con el mes de Octubre.

Los estudios histológicos de añil mostraron que las hojas presentan las estructuras típicas de las plantas dicotiledóneas. Sin embargo, en la región del mesófilo, entre el parénquima esponjoso y el de empalizada se observó una capa de células de color rojo constituidas principalmente de vacuolas, las cuales acumulan metabolitos que podrían ser precursores de la formación de índigo e indurrubina o taninos, aunque su identidad no pudo ser demostrada en este trabajo.

En el pre-tratamiento de las muestras antes de la extracción, el secado de las plantas de añil mostró ser una alternativa adecuada para el almacenamiento y el transporte de la materia prima, lo que permitiría realizar la cosecha en un lugar y un tiempo diferente al sitio de cultivo. Los mayores rendimientos se obtuvieron con hojas deshidratadas por exposición directa al sol. En tanto que el tamizado de las muestras con una malla de 0.25 mm permitió incrementar el porcentaje de índigo en el colorante al eliminar la fracción de materia vegetal (principalmente tricomas) que se arrastra junto con el colorante durante la extracción.

Los rendimientos de colorantes durante la extracción fueron similares cuando se utilizaron relaciones de materia prima /solvente de 1/20 hasta 1/6.5 y disminuyeron notablemente cuando se incremento la cantidad de materia vegetal en el medio (1/5), probablemente debido a la saturación del solvente. El tiempo de extracción en el que se obtuvieron los rendimientos máximos de colorantes fluctuó entre las 6 y las 8 horas. Estos rendimientos se mantuvieron constantes al incrementar el tiempo hasta 28 horas, lo cual demuestra que la extracción, hidrólisis y oxidación de los precursores de índigo en las hojas de añil es un proceso fisicoquímico y enzimático mas que una fermentación, como se suponía hasta el momento (CIDB, 1999; Barrera y Ramírez 2003).

El rango de temperaturas óptimo para la extracción fue de 25-35° C, a diferencia de lo que ocurre en la extracción de colorantes de plantas de pastel (*Isatis tinctoria*), en las que los rendimientos óptimos se obtienen a temperaturas cercanas a los 70° C (Matadamas-Ortiz, 2002). Esto es concordante con la información que existe respecto a que los precursores presentes en el pastel pueden hidrolizarse por tratamientos físico-químicos, mientras que

para el añil se requiere la presencia de una enzima para que la hidrólisis del indican se lleve a cabo (Kokubun *et al*, 1998).

Respecto al pH de extracción, se encontraron diferencias notables en los rendimientos al variar los valores de este parámetro, destacando la disminución de los rendimientos cuando se utilizaron medios de extracción ácidos, un buen rendimiento de índigo a valores neutros (pH 7) y alcalinos (pH 12) y un incremento en la concentración de indirrubina en el colorante en medios alcalinos (pH 12).

No se encontraron diferencias significativas en los rendimientos al variar el tiempo de aireación entre 10 y 30 minutos, pero el efecto del pH de aireación sobre la concentración de índigo en el colorante sí fue notable. Los mejores rendimientos se obtuvieron a pH 8.

El principal efecto de la aplicación de ultrasonido a la extracción de colorantes de añil es la reducción del tiempo de extracción desde 6 hasta 2 horas. Por otra parte, tanto el pH como el tiempo de extracción tuvieron efecto sobre los rendimientos de CAP, índigo e indirrubina. Al igual que en la extracción sin ultrasonido, los mayores rendimientos de CAP e índigo se obtuvieron a pH 7, siendo estos de 1.79 g/100 de hoja seca y de 3 mg/g de hoja seca respectivamente. A pH 12 se obtuvo la mayor cantidad de indirrubina cuyo valor fue 1.6 mg/g de hoja seca. Estos valores fueron ocho veces mayores que los obtenidos en el tratamiento testigo (sin control de pH, 28° C, 6 horas, sin ultrasonido). Cuando se escaló la extracción de colorantes con ultrasonido al equipo de 30 L, se obtuvieron resultados concordantes con los obtenidos a nivel laboratorio.

Los resultados de este trabajo demuestran la posibilidad de mejoramiento en el proceso de producción de colorantes a partir de plantas de añil, lo que abre una serie de oportunidades para la continuidad de investigaciones sobre esta línea.

Una de las perspectivas de trabajo se refiere a la investigación a profundidad de los diferentes precursores de índigo que se acumulan en las plantas durante el cultivo, así como la caracterización química de estos compuestos, de tal forma que los resultados sirvan como base para determinar cuales son los principales factores fisicoquímicos y ambientales que influyen sobre la biosíntesis de estos metabolitos.

Dadas las características de la hidrólisis del indicán, se recomienda trabajar también en la caracterización de las enzimas que intervienen en la producción de indigoides en plantas de añil.

Con miras al escalamiento del proceso se recomienda realizar experimentación piloto sobre la influencia combinada de los diferentes parámetros de extracción (Temperatura, pH, tiempo de extracción, aireación), sobre la producción de colorantes de añil, así como

ensayar a mayor escala la extracción por ultrasonido. Por otra parte, se recomienda trabajar en la optimización del proceso de secado.

Se recomienda trabajar además en la caracterización y evaluación de las posibles aplicaciones de otros metabolitos derivados de la planta, tales como los taninos (los cuales tienen potencial antioxidante) y la indirrubina (que ha mostrado tener actividad anti-inflamatoria y antileucémica). Así como en otros posible usos además del textil del índigo derivado del añil.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. Agustín EO, Ortal CI, Pascua SRJR, Cruz PCS, Padre AT, Ventura WB, Obien SR, Ladha JK. 1999. Role of indigo in improving the productivity of rainfed lowland rice based cropping systems. The Rainfed Lowland Rice Research Consortium. Experimental Agriculture 35(2):201-210.
2. Alonso- Salces RM, Barranco A, Corta E, Berruela LA, Gallo B, Vicente F. 2005. A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues comparison with pressurised liquid extraction. Talanta 65:654-662.
3. Amos S, Binda L, Kunle OF, Okafor I, Emeje M, Akah PA, Wambebe C. and Gamaniel K. 2003. Smooth muscle contraction induced by *Indigofera dendroides* leaf extracts may involve calcium mobilization via potential sensitive channels. Phytotherapy research 17:792-796.
4. Angelini LG, Campeol E, Tozzi S, Gilbert KG, Cooke DT, Jonh P. 2003. A new HPLC-ELSD method to quantify indicant in *Polygonum tinctorium* L. and to evaluate β -glucosidase hydrolysis of indicant for indigo production. Biotechnology Progress 19:1792-1797.
5. Anónimo. 1999. El puntero. Apuntado con apuntes breves. Reimpresión de la edición de 1641. Consejo Nacional para la Cultura y el Arte. San Salvador, El Salvador CA.
6. Arias-Castro C. y Sandoval-Salas F. 1999. Evaluación y caracterización de la especie añil (*Indigofera suffruticosa*) para la obtención de colorante en el estado de Jalisco y Colima. Informe técnico del proyecto externo. División de Biosíntesis de Productos Vegetales CIATEJ, A.C. Jalisco, México.
7. Awadh NA, Jülich WD, Kusnick C and Lindequist U. 2001. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and citotoxic activities. Journal of Ethnopharmacology 74(2):173-179.

8. Barrera HF y Ramírez AG. 2003. Programa de recuperación del cultivo del añil en la tierra caliente de Michoacán, 1999-2002. Casa de las Artesanías del Gobierno del estado de Michoacán de Ocampo. Michoacán México. 64 pp.
9. Barrios E and Cobo JG. 2004. Plant growth biomass production and nutrient accumulation by slash/mulch agroforestry systems in tropical hillsides of Colombia. *Agroforestry systems* 60(3):255-265.
10. Bechtold T, Turcanu A, Geissler S, Ganglberger E. 2002. Process balance and product quality in the production of natural indigo from *Polygonum tinctorium* Ait. Applying low-technology methods. *Bioresource Technology* 81:171-177.
11. Bello-Marini. 2005. Tie-dyeing in Indigo. [http.att.net/bellomarini/dyeplants.html](http://att.net/bellomarini/dyeplants.html).
12. Bouchilloux S et Roche J. 1955. Contribution a l'étude biochimique de la pourpre des Murex. Bulletin de l'Institut Océanographique No. 1054. Ed. Fondation ALBERT 1^{er}, Prince de Monaco. Marseille, France. 23 pp.
13. Brickell C. 1996. Enciclopedia de plantas y flores. Ed. Grijalbo. Verona Italia. 633 pp.
14. Bryant J. 1985. Speed physiology. Institute of biology in London. Great Britain. p.p. 1:80.
15. Cardador- Martínez A, Loarca-Piña G, Dave Oamah B. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6975-6980.
16. Cardon D et Chatenet G. 1990. Guide des teintures naturelles. Plantes, Lichens, Champignon, Mollusques et Insectes. Paris. Ed. Delachaux et Niestlé.

17. Chanayath N, Slhieochaiphant S, Phutrakul S. 2002. Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn and *Baphicacanthus cusia* Brem and chemical structure analysis of their mayor components. Chiang Mai University Journal 1(2):149-160.
18. Chemat S, Lagha A, AitAmar H, Bartels PV and Chemat F. 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. Flavour and Fragrance Journal 19: 188-195.
19. Christina AJM, Alwin JM, Jerry HRS, Kothai R, Chidambarsnathan N, Muthumani P. 2003. Efecct of *Indigofera aspathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. Fitoterapia 74(12) :280-283.
20. CIBB (Centro de Investigación y Desarrollo Binniza A.C.). 1999. El añil en Oaxaca. En "El tecolote". Boletín de la Comisión de Defensa Ecológica. AñoVI, 3ª época, No. 1. México. pp 2-7.
21. Clark RJH, Cooksey CJ, Daniels MAM, Withnall R. 1993. Indigo, woad, and tirian purple: important vat dyes from antiquity to the present. Endeavour, New Series 17(4):191-199.
22. De Magistris A, Angyalossy-Alfonso A, Castro MA. 2000. A modified histological technique for bark anatomical study. Boletin de la Sociedad Argentina de Botánica 35(1-2):85-90.
23. De Puymaurin. Instruction sur l'art d'extraire l'indigo contenu dans les feuilles du pastel. Fabrique impeériale de l'indigo-pastel á Toulouse. Paris, France.42 pp.
24. Deshpande SS and Cheryan M. 1987. Determination of Phenolic Compounds of Dry Beans Using Vanillin, Redox and Precipitation Assays. Journal of Food Science 52(2): 332-334.
25. Doukyu N, Arai T, Aono R. 1998. Effects of organic solvents on indigo formation by *Pseudomonas* sp. Strain ST-200. Extremophiles 1 :100-105.

26. Doukyu N, Toyoda K, Aono R. 2002. Indigo production by *Escherichia coli* carrying the phenol hydroxylase gene from *Acinetobacter* sp strain ST-550 in a water-organic solvent two phase system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (6) :720-725.
27. Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. 2004. Molecular mechanism of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 130:627-635.
28. Ensley BD, Ratzkin BJ, Osslund TD, Simon MJ, Wackett LP, Gibson DT. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222:167-169.
29. Ensley Jr and Burt D. 1985. Microbial production of indigo. USP 4,520,103.
30. Entesari MH, Nazary SH, Khodaparast MHH. 2004. The direct effect of ultrason on the extraction of date syrup and its micro-organism. *Ultrasonics sonochemistry* 11:379-384.
31. Epstein E., Nabors MW, Stowe BB (1967). Origin of indigo of woad. *Nature* 216:517-549.
32. Esau K. 1985. *Anatomía Vegetal*. Ediciones Omega S.A., Barcelona. 779 pp.
33. Esimone CO, Adikwu M.U, Muko KN. 1999. Antimicrobial properties of *Indigofera dendroides* leaves. *Fitoterapia* 70(5):517-520.
34. Eyal J, Mabud AMD, Walter FJ. 1991. Production of indigotin in submerged culture using *Morchella* nov ES-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 30:303-312.
35. Eyal J and Spencer MG. 1991. Natural blue pigment. USP No. 5,077,201.

36. Falange H y Bobbio GP. Identification of indigo produced in submerged culture of *Agaricus campestris*, mutant culture. Archives of Biochemistry and Biophysics. 96:430-433.
37. Farah K.O., Tanaka F., West N.E. 1988. Autoecology and population biology of dyers woad (*Isatis tinctoria*). Weed Science **36**: 186-193.
38. Fernández MJA. 2003. Pintando el mundo de azul. El auge añilero y el mercado centroamericano 1750-1810. Biblioteca de Historia Salvadoreña, Vol. 14: Consejo Nacional para la Cultura y el Arte (CONCULTURA), San Salvador, El Salvador CA. 367 pp.
39. Frías SCA. 2001. Caracterización de una columna de extracción empacada. Tesis Profesional para obtener el grado de Ingeniero Químico. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México. 86 p.
40. Gamble JS. 2002. An account of the growth distribution and uses of the trees and Shubs of India and Ceylon with description of their wood-structure. Reprint Dehradun, Intenational . 868 pp.
41. Gan, W, Yang T, Wen S, Liu Y, Tan Z, Deng C, Wu J, L M. 1985. Studies on the mechanism of indirubin action in treatment of chronic myelocytic leukemia (CML). II. 5'-Nucleotidase in the peripheral white blood cells of CML. Chinese Journal of Hematology. 6:611-613.
42. García-Macías P and John P. 2004. Formation of natural indigo derived from woad (*Isatis tictoria* L.) In relation to Productct Purity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:7891-7896.
43. Gilbert KG and Cooke DT. 2001. Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential. Plant Growth Regulation 34:57-69.
44. Giobert M. 1813. Traité sur le pastel et l'extraction de son indigo. Paris.

45. Goto M, Nara T, Terasawa, M, Yukawa H. 1996. Process for preparing indigo. USP 5,496,715.
46. Hromádkova Z and Ebringerová A. 2003. Ultrasonic extraction of plant materials- investigation of hemicellulose release from buckwhheat hulls. Ultrasonics Sonochemistry 10: 127-133.
47. Hui L, and Masao EI. 1994. Effects of ultrason on extraction of saponin from ginseng. Japanese. Journal Applied Physics. Part 1 33 (5B):3085-3087.
48. Hurry JB. 1930. The woad plant and its dye. London. Oxford Univ. Press.
49. Index Merck. The Index Merck of chemicals and drugs.1953. Merck and Co. Inc. Rahway, N.J., USA. pp. 784-785.
50. Infante GS y Zárate LGP. 1997. Métodos estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Ed. Trillas. México, D.F. 643.
51. Itoh S, Ohno S, Hasegawa N, Takahashi H. 1989. Resonance raman study of the structures of trans and cis isomers and the C=C stretching frequencies of N,N'-derivatives of indigo. Journal of Raman Spectroscopy 20:423-430.
52. JMP[®]. 1999. Statistic Made Visual Version 3. SAS Institute Inc, SAS Campus Drive.
53. Keya GA. 1997. Effects of defoliation on yield and reproduction of the dwarf shrub *Indigofera spinosa*. Acta Oecologica Montrouge 18(4):449-463.
54. Kim JH, Shin JH, Lee HJ, Chung IS, Lee HJ. 1997. Effect of chitosan on indirubin production from suspension culture of *Polygonum tinctorium*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 83:206-208.
55. Kirk R, Othmer D, Scott J, Standen A. 1962. Enciclopedia de Tecnología Química. México. DF. Tomo V pp 354-373.

56. Kirk R, Othmer DF, Kroschwitz J, Howe-Grant M. 1993. Encyclopedia of Chemical Technology (Kroschwitz J and Howe-Grant M Eds.) Volume 10. John Willey and Sons Inc. New York. pp 181-195.
57. Kokubun T, Edmonds J, John P (1998). Indoxil derivatives in woad in relation to medieval indigo production. *Phytochemistry* 49(1):79-87.
58. Ku QV. 1997. El añil en el sur del istmo Oaxaqueño. Perspectivas de sustentabilidad de los sistemas agrícolas actuales. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. México.
59. Kunikata T, Tatefuji T, Aga H, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. 2000. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *European Journal of Pharmacology* 410:93-100.
60. Li H, Pordesimo L, Weiss J. 2004. High intensity ultrason-assisted of oil from soybeans. *Food Research International* 37: 731-738.
61. Littman ER. 1980. Maya blue - a new perspective. *American Antiquity* 45(1) :87-100.
62. Luque-García JL and Luque de castro MD. 2003. Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry* 22(1): 41-47.
63. Maier W, Schuman B, Gröger D (1990). Biosynthesis of indoxyl derivatives in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. *Phytochemistry* 29(3):817-819
64. Marcinek H, Weyler W, Deus-Neumann B, Zenk MH (2000). Indoxyl –UDPG-glucosyltransferase from *Baphicacanthus cusia*. *Phytochemistry* 53:201-207.
65. Marero LM, Hyeong Jin J, Han Shin J, Jae Lee H. 1997. Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. *Enzyme and Microbial Technology* 21:97-101.

66. Mark K and Ho W. 1995. Degradation of indigo and indigo carmine with an enzyme isolated from bacteria ATCC 55396. USP 5,457,043.
67. Martínez M. 1979. Plantas medicinales de México. México D.F. p.p 38-40.
68. Marzocca A. 1993. Index de plantas colorantes, tinctóreas y curtientes. Buenos Aires. 133-137.
69. Matadamas-Ortíz EJ. 2002. Etude et Caracterisation des matieres colorantes du pastel (*Isatis tinctoria* L)- Determination des conditions optimales d'extraction pour leur utilisation a l'échelle industrielle. These de Docteur de l'Institut polytechnique de Toulouse. Spécialité Sciences des Agroressources. LCA INRA/INP-ENSIACET Toulouse, France. 250 pp.
70. Maugard, Enaud T, Choisy P and Legoy D. 2001. Identification of an precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). Phytochemistry 58:897-904.
71. McGovern PE, Lazard J, Michel RH. 1990. The analysis of indigoid dyes by mass spectrometry. Journal of the Society of Dyers and Colorist 106:22-25.
72. McLean E.K. 1970. The toxic actions of pyrrolizide (Scenecio) alkaloids. Pharmacology Review 22:429.
73. Mederos RSI. 2001. Establecimiento de cultivo vegetales de añil (*Indigofera suffruticosa*) para la producción *in vitro* de colorante natural azul. Tesis profesional para obtener Título de Químico Fármaco Biólogo. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. 72 pp.
74. Michel RH, Lazar J, McGovern PE. 1992. The chemical composition of the indogoid dyes derived from the hypobranchial glandular secretions of *Murex* molluscs. Journal of the Society of Dyers and Colorist 108:145-150.

75. Miller D. 1999. Indigo from seed to dye. Indigo Press, Santa Cruz California ISBN09604060-1-8. 61 pp.
76. Minami Y, Kanafuji T, Miura K (1996). Purification and characterization of a β -glucosidase from *Polygonum tinctorium*, which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60(1):147-149.
77. Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H (1997). β -glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant and Cell Physiology* 38(9):1069-1074.
78. Minami Y, Nishimura O, Hara Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H (2000). Tissue and Intracellular Localization of Indican and the purification and characterization of Indican synthase from indigo plants. *Plant and Cell Physiology* 41(2):218-225.
79. Mozino SFJM. 1994. Tratado del xiquilite y añil de Guatemala. La grana y el añil. Técnicas tinóreas en México y América Central (Sarabia Viejo MJ, Ed.). Publicaciones de la Escuela de Estudios Hispano-Americanos de Sevilla. Cat. 374.
80. Murdock, 1994. Enhanced indole biosynthesis. USP 5,374,543.
81. Nyarko AK, Sittie AA and Addy M.E. 1993. The basis for anti-hyperglycemic activity of *Indigofera arrecta*. *Phytoteraphy Research* 7:1-4.
82. Oberthür C, Schneider B, Graf, H, Hamburguer M (2004). The Elusive Indigo Precursors in Woad (*Isatis tinctoria* L.) - Identification of the Major Indigo Precursor, Isatan A, and a Structure Revision of Isatan B. *Chemistry & Biodiversity* 1(1):174 – 182.
83. Oriel P and Kim IC. 1998. Method for production of indigo and indirubin dyes. USP 5,834,297.

84. Pardo GY. 1983. Colorantes II. Curso sobre colorantes ESIT, IPN, México, DF. pp 1-65.
85. Pérez LOA. 2001. Cinética de extracción de colorantes naturales para la industria textil. Tesis profesional para obtener el título de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Universidad de la Américas, Puebla, México.
86. Reyes-Salas EO, Manzanilla-Cano JA, Barceló-Quintal MH, Ramírez-Balderas J. 2004. Direct electrochemical determination of índigo in dimetil sulfoxide. *Analytical Letters*: 37(3):463-472.
87. Robinson RA. 1978. Buffer solutions operacional definitions of pH. In *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (Ed. Weast RC). CRC PRESS, INC, Florida, pp. D133-D140.
88. Romdhane M and Gourdon C. 2002. Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal* 87: 11-19.
89. Rossignon J. 1884. Manual del cultivo del añil y del nopal. Extracción del indigo. Imp. De la Secretaria de Fomento, México. 232 pp.
90. Sánchez SO. 1984. La flora del Valle de México. Ed. La Prensa, México D.F. 519 pp.
91. Schinor EC, Salvador, MJ, Turatti ICC, Zuchi OLDA, Dias DA. 2004. Comparison of classical and ultrason-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Cresta spp*. *Ultrasonics Sonochemistry* 11:415-421.
92. Schlattmann JE, ten Hoopen JG, Heijnen JJ. 1996. Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures. In *Plant cell culture secondary metabolism. Toward industrial application* (DiCosmo F and Misawa Eds). CRC Press, Inc USA. pp. 11-45.

93. Shah S, Saharma A, Gupta MN. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. *Bioresource Technology* 96:121-123.
94. Shin JH and Lee JH. 1993. Cultural conditions and growth characteristics of indigo (*Polygonum tinctorium*) cells in an air lift bioreactor. *Kor. J. Biotechnology and Bioengineering* 8:193-199.
95. Sing B, Saxena AK, Chandan BK, Bhardwaj V, Gupta VN, Suri OP, Handa SS. 2001. Hepatoprotective activity of Indigtone-A bioactive fraction from *Indigofera tinctoria* Linn. *Phytotherapy Research* 15:294-297.
96. Siddhuaraju P, Vijayakumari K, Janardhanan K. 1995. Studies on the underexploited legumes, *Indigofera linifolia* and *Sesbania bispinosa*: nutrients composition and antinutritional factors. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 46(3):1995-2003.
97. Sittie AA and Niarko AK. *Indigofera arrecta*: Safety evaluation of an antidiabetic plant extract in non-diabetic human volunteers. *Phytotherapy Research* 12:52-54.
98. Steel y Torrie. 1993. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Editorial McGraw-Hill. México D.F. 621 pp.
99. Steel y Torrie. 1993. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Editorial McGraw-Hill. México D.F. 621 pp.
100. Stoker GK, Cooke TD, Hill JD. 1998. An Improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo. *Journal of Agricultural Engineering Research* 71:315-320.
101. Strobel J und Gröger D. 1989. Über das vorkommen von indigovorstufen in *Isatis*-species. *Biochemie und Physiologie Pflanzen* 184:321-327.

102. Sy A, Grozyus M, Danthu. 2001. Seed germination of seven Sahelian legume species. *Journal of Arid Enviroments* 48:875-882.
103. Tangadurai D, Ramesh N, Viswanathan MB, Prasad DX. 2001. A novel xanthene from *Indigofera longeracemosa* stem. *Fitoterapia* 72:92-94.
104. Tangadurai D. Viswanathan MB, Ramesh HN. 2002. Indigoferabietone, a novel diterpenoid from *Indigofera longeracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity. *Pharmazie* 57(10):714-715.
105. Tatsch E and Schrader B. 1995. Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy of indigoids.
106. Tiefeng-Xu, Lei-Zhang, Xiaofen-Sun, Hanming-zhang, Kexuan-Tang. 2004. Production and analysis of organic acids in hairy-root cultures of *Isatis indigoica* Fort. (Indigo woad). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39:123-128.
107. Thomas Y. 1998. Etude et mise au point de differentes methods d'analyses des pignts indigoïdes presents dans *Indigofera suffruticosa suffruticosa* M. Rapport de stage. Lab. Sciences des Agroressources, ENSACT, INPT. 90pp.
108. Trotman E.R. 1990. Dyeing and chemical technology of textile fibre. Sixt Edition. Hodder and Stoughton, London. pp 407-421.
109. Umar DM. 1999. Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 64(3):277-282.
110. USDA. 2005. ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL:<http://www.ars-grin.gov2/cgi-bin/npgs/html/family.pl> 819 (2005).
111. Venkataraman, K. 1952. Chemistry of synthetic dyes: New Cork. Ed. Academic Press. Vol. 2. pp. 1003-1022.

112. Vilarem G, Dumont V, Gaset A. 1997. Extraction assistée par ultrasons Oleagineux Corps Gras Lipides 4:42-45.
113. Villers T. 1979. Reposo y supervivencia de las plantas. Editorial Omega S.A. Barcelona España. p.p. 1-125.
114. Von Denffer D, Ehrendorfer F, Bresinsky A, Ziegler H. 1993. Tratado de Botánica. Redactado inicialmente por Strasburger E, Nol F, Schenck H, Schimper AFW. Ediciones Omega. Barcelona España. 1078 pp.
115. Waterhouse AL. 2001. Determination of Total Phenolics. In Current Protocols in Food Analytical Chemistry, I1.1.1-I1.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley.
116. Weier TE, Stoking GR, Barbour MC. 1983. Botánica. Editorial LIMUSA, México, DF. 741 pp.
117. Winker M and Schimmer O. 2000. Modes of action of defensive secondary metabolites. In Function of plant secondary metabolites and their exploitation in Biotechnology. Annual Plant Reviews Vol. 3 (Wink M, Ed). CRC Press LLC, Boca Ratón Florida. 362 pp.
118. Wouters J and Verhecken A. 1991. High-performance liquid chromatography of blue and purple indigoid natural dyes. Journal of the Society of Dyers and Colorist 107:266-269.
119. Wu E, Komolpis K, Wang HY. 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity.
120. Xia Z y Zenk MH (1992). Biosynthesis of Indigo Precursors in Higher Plants. Phytochemistry 31(89):2695-2697.
121. Yacamán MJ and Serra-Puche MC. 1995. High resolution electron microscopy of maya blue Saint. Materials Research Society Symposium. Proceedings. 352:3-11.

122. Zuo Y, Zhang L, Wu J, Fritz JW, Medeiros S, Rego C. 2004. Ultrasonic extraction and capillary gas chromatography determination of nicotine in pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta* 526: 35-39.

ANEXO 1. Números CAS de los compuestos químicos mencionados en este trabajo.

Compuesto	No. CAS
1. Indigo, C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂ (2-(1,3-dihidro-3-oxo-2H-indol-2-ilideno))	482-89-3
2. Indigo carmín (Acido disulfónico 5'5)	860-22-0
3. Ácido linoleico	60-33-3
4. Indicán (indoxil-β-D-glucósido)	487-60-5
5. D-glucosa	50-99-7
6. Isatina	91-56-5
7. Indirrubina	479-41-4
8. L-Triptofano	73-22-3
9. Leuco índigo	6537-68-4
10. 6,6'-dibromoíndigo	19201-53-7
12. Indol	120-72-9
13. Indol dihidrodiol	120-72-9
14. Naftaleno	91-203
15. Acido ftálico	88-99-3
16. Ftálico anhídrido	85-44-9
17. Ftalimida	85-41-6
18. Acido antranílico	118-92-3
19. Fenilglicina	2835-06-5
20. Anilina	62-53-3
21. β-hidroxietilanilina	2454-37-7

Fuente: <http://www.nist.gov/srd/analy.htm>